

**Aplicación de la estrategia RIVET para la
identificación de genes de *Ralstonia
solanacearum* expresados durante la infección en
papa.**

Analía Sanabria

**Manuscrito presentado para cumplir con los requerimientos para la
obtención del título de:**

Doctor en Química

**Facultad de Química – UdelaR
2014**

**Tutor: Dra. Ma. Julia Pianzola
Co – tutor: Dr. Saúl Burdman**

All I really need to know about how to live and what to do and how to be I learned in kindergarten. Wisdom was not at the top of the graduate-school mountain, but there in the sandpile at Sunday School. These are the things I learned:

Share everything.

Play fair.

Don't hit people.

Put things back where you found them.

Clean up your own mess.

Don't take things that aren't yours.

Say you're sorry when you hurt somebody.

Wash your hands before you eat.

Flush.

Warm cookies and cold milk are good for you.

Live a balanced life - learn some and think some and draw and paint and sing and dance and play and work every day some.

Take a nap every afternoon.

When you go out into the world, watch out for traffic, hold hands, and stick together.

Wonder. Remember the little seed in the Styrofoam cup: The roots go down and the plant goes up and nobody really knows how or why, but we are all like that.

Goldfish and hamsters and white mice and even the little seed in the Styrofoam cup - they all die. So do we.

And then remember the Dick-and-Jane books and the first word you learned - the biggest word of all - LOOK.

And it is still true, no matter how old you are - when you go out into the world, it is best to hold hands and stick together.

Robert L. Fulghum

Agradecimientos

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de las siguientes instituciones, agencias y programas: Facultad de Química – Universidad de la República, PEDECIBA Química, Universidad Hebrea de Jerusalem, Beca de Posgrado – LATU, Beca de Movilidad ANII BE_MOV 869, Proyecto Fondo Clemente Estable ANII FCE 2902, Proyecto CSIC Grupos 1141 y Beca de Doctorado ANII POS_NA 8602.

Mientras escribo las palabras de agradecimiento, se termina el partido Uruguay – Inglaterra. Todo el país festeja como si hubiéramos ganado la final, y yo con los tres millones. No se que ocurrirá con la selección para cuando defienda la tesis: a veces se pierde, a veces se gana, pero lo importante es dejar todo en la cancha. A veces, la cancha es la mesada e Inglaterra es una (nueva) conjugación que no funciona. O Salvotelli. Pero *lacZ* deja a *Ralstonia* celeste, y una se sorprende abrazando una placa de Petri.

Muchas personas están detrás de esta tesis, porque la ciencia se juega en equipo. En primer lugar quiero agradecerles a mis tutores, Ma. Julia y Saúl, por ser dos personas que entienden que las fronteras no están en los contornos geográficos, sino en los límites que uno se ponga y por creer, quizás erróneamente, que era capaz de llevar a cabo este proyecto.

Algunas personas me dieron consejos muy valiosos (ya sea en persona o mediante ricos intercambios escritos) que ayudaron a destrabar nudos gordianos: Freddy Monteiro, Leonardo de la Fuente, Mauricio Lozano, José Osorio y Raúl Platero. Tampoco puedo olvidarme de Ana Karen Malán (IIBCE), que me asistió en la realización del *Southern Blot* o de Alicia Castillo, que muy generosamente facilitó las instalaciones de Biotecnología en INIA, Las Brujas, para micropropagar *S. tuberosum*.

A Matilde Soubes, que estuvo al frente de la Cátedra de Microbiología durante la mayor parte de mi tesis: siempre me hizo sentir como en casa y estuvo a la orden para pulir cualquier inconveniente administrativo que se presentara.

Mis compañeros de la Cátedra, que amenizaron almuerzos, meriendas y a veces hasta cenas; es muy difícil nombrarlos a todos pero no puedo dejar de mencionar a algunas personas que le dan una impronta al laboratorio: Meche, Wilson, Andrea, Bea, la rubia, que ya no están pero cómo llenaban el espacio cuando estaban; Lu e Inés, las Silvanas (V,T y Doña Sabores), Ana, Javier, Anita A. y sus ticholos, Carola, Anita Ingold queridísima reina del cuartito, Ada, Gaby, Gastón, Andrea y en el 12: Paola, Vicky, Maria,Vale, el trío dinámico: Rodrigo, Diego y César (¿cuántas pizzas del Alcalá, Coca Colas y Segunda Pelota habremos compartido?). Las Marianas, B y R, que hicieron (y hacen) mi vida mucho más feliz: sus consejos son invalorable. A mi pequeña Maria Inesita, que vale MIL, que fue mis manos cuando me quedé sin dedo.

A Matías, por su honradez, su diligencia y su responsabilidad para trabajar en este proyecto. Trabajar a tu lado fue un placer.

Hay dos personas a las que les debo un agradecimiento superlativo: Sonia, por su rebeldía inteligente, por que nunca se rinde y es un ejemplo, porque siempre supo agarrarme en un rellano y decirme las palabras justas, porque nunca dejó de pensar experimentos que me pudieran salvar la tesis; Gianna, que pasan los años (son 9!) y sigue siendo mi hada madrina de clonaciones y afines, tantas gracias tantas por ser una brillante científica y una amiga adentro y afuera del laboratorio. Nunca me van a alcanzar las palabras para decirte todo lo que te agradezco y lo importante que fue tu ayuda.

A mis compañeros del Laboratorio de Saúl Burdman (Department of Plant Pathology - HUJI), que me hicieron sentir más que bienvenida, especialmente Tally Rosemberg, que dejó su propio trabajo para orientarme y Dafna Tamir, por sus secretos de cocina. A Luciana Nathan, mi shutafá y mi hermana, por ser mi familia a 10 mil kilómetros de casa. Y por seguir ahí.

A mis afectos, los amigos de F100 por tantas charlas científicas y de las otras; a Alvarito y nuestro *co-working, co-chatting & co-eating* de tesis y a las nenas por el *Girls in silico, videoconf powered by Google*, que me hacen tanto bien al alma. La Familia, por otras tantas charlas de fútbol, Roma antigua y la WWII. A Eli, por ser tan ella. A Anita, por estar cuando la necesito: no estoy a tu altura. A mis dos familias: la Martinez Aguerre por bienvenirme, la Sanabria Keochgerian por ser perpetuos *supporters (since 1981)*, los amo. A Bruno, que conjuga el verbo *to be* como nadie: sabe ser y sabe estar.

A El.

Montevideo, 19 de junio 2014.

Resumen

Ralstonia solanacearum es la bacteria responsable de una enfermedad de relevancia mundial, la marchera, que afecta a un amplio rango de cultivos de importancia económica como tomate, papa, berenjena y tabaco. En Uruguay este patógeno impacta, desde hace algunos años, seriamente en la producción de papa, uno de los principales cultivos hortícolas. El complejo diálogo patógeno-hospedero implica un primer paso de reconocimiento, interacción del patógeno con el sistema de defensa de la planta, colonización y adaptación al nuevo medio ambiente. Por mucho tiempo, los estudios sobre los mecanismos de patogenicidad se llevaron a cabo por medio de ensayos en condiciones de laboratorio bien definidas. Si bien estos estudios *in vitro* permitieron muchos avances, los microorganismos coexisten en sistemas complejos y establecen con su hospedero interacciones difíciles de reproducir en el laboratorio.

En los últimos años se diseñaron nuevas estrategias con el objetivo de detectar genes de virulencia de la bacteria *in vivo*. Un ejemplo ha sido la técnica de RIVET (*Recombinase-based In Vivo Expression Technology*) que permite detectar promotores del patógeno que son activados débil o transitoriamente durante el proceso de infección.

El objetivo planteado en esta tesis es la identificación genes de *R. solanacearum* raza 3, biovar 2 que se expresan durante la infección de papa (*Solanum tuberosum*), utilizando esta técnica. Primero, se construyó una cepa reportera de *R. solanacearum* insertando el *cassette res (res-Km^R-sacB-res)* en un gen neutro para la virulencia. Luego, se conjugó la cepa reportera con un miniT5 que posee la fusión *tnpR:lacZ* sin promotor. El *pool* de microorganismos resultantes se emplea para infectar a la papa. El gen *tnpR* codifica para una enzima resolvasa que reconoce y escinde los sitios *res*. Si un promotor de la bacteria, que se

encuentra *upstream* a la fusión *tnpR:lacZ* sin promotor, es activado por señales específicas de la planta, su expresión provoca la pérdida del *cassette res* y por ende, la pérdida de la resistencia a kanamicina (Km), lo que permite realizar una lista de promotores que se activan *in vivo*. En esta tesis se construyó y caracterizó la cepa reportera de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2. Luego, se conjugó esta cepa reportera con el miniT5, que posee la fusión *tnpR:lacZ* sin promotor, para obtener un *pool* de transconjugantes. Un subconjunto de clones transconjugantes de este *pool* se empleó para inocular la planta. Mediante los ensayos realizados, se confirmó que el sistema RIVET construido es funcional en el patosistema papa – *R. solanacearum* y se aislaron clones transconjugantes con promotores activados específicamente por señales de la planta. El estudio deberá ser ampliado para abarcar la totalidad del *pool* de microorganismos con el que se cuenta y caracterizar genóticamente los clones recuperados de la planta, a fin de generar una lista de promotores de *R. solanacearum* que se activan en la planta.

Contenido

Agradecimientos	5
Resumen	7
Contenido	9
Lista de Figuras	13
Lista de Tablas	15
Abreviaturas empleadas en el texto	17
Generalidades sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> y la estrategia RIVET.	19
1.1. <i>Ralstonia solanacearum</i> : agente causal de la marchera de la papa.	19
1.2. Características generales de <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
1.2.1. Clasificación de <i>R. solanacearum</i> : un complejo de especies.	20
1.2.2. Características generales del genoma de <i>R. solanacearum</i> : excepcionalmente diversa....	23
1.2.3. Características del hospedero y distribución geográfica del patógeno.	25
1.2.4. Ciclo de infección.....	26
1.3. Factores de virulencia de <i>Ralstonia solanacearum</i>	30
1.3.1. Productos extracelulares.....	31
1.3.2. El sistema de secreción de tipo III.	34
1.3.3. Otros factores de virulencia.	45
1.3.4. Consideraciones sobre los factores de virulencia.	47
1.4. Estudio de las interacciones planta-hospedero: IVET y RIVET.	49
1.4.1. IVET y RIVET: construyendo trampas de promotores.	51
1.4.2. Antecedentes de estudios <i>in vivo</i> en <i>R. solanacearum</i>	56
1.5. Objetivos.	57
Desarrollo de la cepa reportera de <i>Ralstonia solanacearum</i> UY031.....	59
2.1. Introducción.	59
2.2. Materiales y métodos.....	61
2.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios.....	61
2.2.2. Manipulación del ADN.....	61
2.2.3. Diseño de <i>primers</i> y optimización de las reacciones de amplificación.	62
2.2.4. Análisis de secuencias.	64
2.2.5. Construcción para obtener la cepa reportera de <i>R. solanacearum</i> UY031 por introducción del <i>cassette res</i>	64
2.2.6. Transformación natural.....	66

2.2.8. Ensayo en plantas.....	68
2.2.9. Curva de crecimiento de los clones transformantes de UY031_res (screening).....	69
2.2.10. Ensayo de estabilidad del <i>cassette res</i> en la cepa reportera.	69
2.2.11. Crecimiento de UY031_res9 en medio rico suplementado con $\geq 10\%$ p/v de sacarosa. .	70
2.3. Resultados.	71
2.3.1. Construcción de la cepa reportera: inserción del <i>cassette res</i> en una zona neutra del genoma de <i>R. solanacearum</i> UY031.	71
2.3.2. Obtención del mutante <i>res</i> (cepa reportera) de <i>R. solanacearum</i> UY031 mediante un evento de doble recombinación homóloga.	72
2.3.3. Verificación de los clones transformantes <i>res</i> (cepa reportera) por PCR.	76
2.3.4. Verificación de la inserción del <i>cassette res</i> en los clones transformantes por <i>Southern Blot</i>	78
2.3.5. Caracterización fenotípica del clon UY031_res9: Ensayo de agresividad en plantas de papa.	80
2.3.5. Caracterización fenotípica del clon UY031_res9: Curva de crecimiento.	82
2.3.6. Verificación de la estabilidad del <i>cassette res</i> en el clon UY031_res9.....	82
2.3.7. Crecimiento de UY031res_9 en medio rico suplementado con $\geq 10\%$ p/v de sacarosa.....	83
2.4. Discusión.	84
Construcción de la genoteca de <i>Ralstonia solanacearum</i> UY031 en el plásmido pBamSL9.	91
3.1. Introducción	91
3.2. Materiales y métodos.....	96
3.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios.....	96
3.2.2. Diseño de <i>primers</i> , optimización de las reacciones de amplificación y análisis de las secuencias.	96
3.2.3. Construcción de los vectores control en la estrategia RIVET.	96
3.2.4. Construcción de la biblioteca genómica de <i>R. solanacearum</i> UY031 en pSLBam9.	100
3.2.5. Introducción de pRIV y los plásmidos control en <i>R. solanacearum</i> UY031_res.....	103
3.2.6. Ensayo para verificar la actividad β -glucuronidasa en las cepas de <i>R. solanacearum</i> UY031_res - control.....	106
3.3. Resultados.	107
3.3.1. Construcción y verificación de vectores control con promotores de los genes <i>hrpB</i> y <i>hrpG</i> para ser utilizados en la estrategia RIVET.	107
3.3.2. Introducción de los vectores control en la cepa reportera UY031_res.	110
3.3.3. Ensayo cualitativo de β -glucuronidasa: verificación del funcionamiento <i>in vitro</i> de la expresión de <i>tnpR-uidA</i> en la cepa reportera transformada con los promotores control.	111
3.3.4. Construcción de la biblioteca genómica de <i>R. solanacearum</i> UY031 en pSLBam9.	113

3.3.5. Introducción de pRIV en la cepa reportera UY031_res.....	116
3.4. Discusión.	117
Construcción de una colección de clones transconjugantes de <i>R. solanacearum</i> mediante el uso de un minitrasposón con <i>tnpR-lacZ</i>.....	121
4.1 Introducción.	121
4.2. Materiales y métodos.....	124
4.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios.....	125
4.2.2. Diseño de <i>primers</i> , optimización de las reacciones de amplificación y análisis de las secuencias.	126
4.2.3. Construcción de una biblioteca de transconjugantes de <i>R. solanacearum</i> UY031_res con el miniTn5 pMES4.	126
4.2.4. Ensayo en planta.	128
4.3. Resultados.	130
4.3.1. Optimización del protocolo de conjugación y verificación del funcionamiento del sistema <i>in vitro</i>	130
4.3.2. Construcción de la biblioteca de transconjugantes de <i>R. solanacearum</i> UY031_res con el miniTn5 pMES4.	132
4.3.3. Ensayo en planta con clones caracterizados <i>in vitro</i> : probando el sistema RIVET.....	133
4.3.4. Verificación de clones resueltos L y R.	135
4.4. Discusión.	137
Consideraciones finales.	141
Bibliografía.	147
Anexo I.	169
AI.1. Introducción.	169
AI.2. Obtención de la cepa reportera por doble recombinación homóloga.	170
AI.3. Obtención de la cepa reportera por microhomología mediada por PCR.	172
Anexo II.	175
Anexo III.	183

Lista de Figuras

Figura 1.1. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias parciales de la endoglucanasa: refleja las relaciones filogenéticas de los secuevares y los filotipos.....	22
Figura 1.2. Organización del genoma de la cepa GMI100 de <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
Figura 1.3. Colonización vascular a distintos niveles de una planta de tomate parcialmente marchita... ..	29
Figura 1.4: Organización genética del cluster <i>hrp</i> de <i>R. solanacearum</i>	36
Figura 1.5. Modelo en el que se le designa un posible rol a las distintas proteínas Hrp en el ensamblaje del aparato de secreción Tipo III de <i>R. solanacearum</i>	38
Figura 1.6. Modelo esquemático de la regulación en cascada de Hrp en <i>R. solanacearum</i>	39
Figura 1.7. Esquema general de la estrategia IVET.	52
Figura 1.8. Esquema general de la estrategia RIVET.....	55
Figura 2.1. Transformación natural.....	67
Figura 2.2. Estrategia de construcción del vector pDUres20.....	74
Figura 2.3. Verificación de la construcción de pDUres20.....	75
Figura 2.4. Fenotipo de clones transformantes <i>res</i>	76
Figura 2.5. Mapa genético de la región de <i>R. solanacearum</i> en la que se inserta el <i>cassette res</i>	77
Figura 2.6. <i>Southern Blot</i> de los clones transformantes <i>res</i>	79
Figura 2.7. Síntomas de plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i> UY031 y con UY031_ <i>res</i>	81
Figura 2.8. Curva de progreso de enfermedad de <i>R. solanacearum</i> UY031 y UY031_ <i>res</i>	81
Figura 2.9. Curva de crecimiento de <i>R. solanacearum</i> UY031 y UY031_ <i>res</i>	83
Figura 3.1. Mapa del plásmido pSLBam9.....	91
Figura 3.2. Estrategia de construcción de los plásmidos control.....	99
Figura 3.3. Estrategia de construcción de la genoteca de <i>R. solanacearum</i> en pSLBam9.....	100
Figura 3.4. Construcción de los plásmidos control pPhrpG y pPhrpB	106
Figura 3.5. Verificación por PCR de la construcción de pRIVPhrpG y pRIVPhrpB.....	107
Figura 3.6. Ensayo cualitativo de β – glucuronidasa.....	109
Figura 3.7. Esquema de integración de pRIVPhrpB en el genoma de UY031_ <i>res</i>	110
Figura 3.8. Optimización de la digestión parcial del ADN genómico de <i>R. solanacearum</i> UY031.....	112
Figura 3.9. Verificación por PCR de la genoteca pRIV.....	113
Figura 4.1. Mapa del plásmido pBAM1.....	120
Figura 4.2. Construcción alternativa a la genoteca pRIV para desarrollar la estrategia RIVET.....	122
Figura 4.3. Caracterización de clones transconjugantes de <i>R. solanacearum</i> UY031_ <i>res</i> con el miniTn5 de pMES4	128

Figura 4.4. Verificación de la resolución del <i>cassette res</i> por PCR.....	129
Figura 4.5. Caracterización de los clones resueltos	133
Figura AI.1. Esquema de la estrategia de obtención de la cepa reportera por doble recombinación homóloga.....	167
Figura AI.2. Esquema de la estrategia de obtención de la cepa reportera por microhomología mediada por PCR	169

Lista de Tablas

Tabla 2.1: Resumen de cepas empleadas.....	62
Tabla 2.2: <i>Primers</i> usados en el Capítulo 2.....	63
Tabla 2.3: Resumen de plásmidos empleados en la generación de la cepa reportera.....	65
Tabla 2.4: Regiones potencialmente neutras del genoma de <i>R. solanacearum</i> IPO1609.....	72
Tabla 2.5: Resumen de las PCR de verificación realizadas sobre los clones transformantes.....	77
Tabla 2.6: Cálculo del AUDPC de la curva de progreso de enfermedad de <i>R. solanacearum</i> UY031 y UY031_res.....	82
Tabla 3.1: Resumen de plásmidos empleados en la construcción de la genoteca y los vectores control.....	96
Tabla 3.2: <i>Primers</i> usados en el Capítulo 3.....	97
Tabla 3.3. Rresultado del Blast de los insertos secuenciados de 3 clones de pRIV	113
Tabla 4.1: Resumen de plásmidos y cepas empleados en la construcción de la biblioteca de transconjugantes	123
Tabla 4.2: <i>Primers</i> usados en el Capítulo 4	124
Tabla AI.1. Genes candidatos a se interrumpidos por el <i>cassette res</i>	166

Abreviaturas empleadas en el texto

ACUR	Uso de codones alternativo (<i>Alternative Codon Usage Region</i>)
Amp	Ampicilina
ANKm	Agar Nutriente suplementado con Kanamicina
ANTc	Agar Nutriente suplementado con Tetraciclina
BG	medio Boucher Genin
DIEA	Dirección de Estadísticas Agropecuarias
DFI	<i>Differential Fluorescence Induction</i>
DO ₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
EPS	Exopolisacárido
Fig	Figura
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gm	Gentamicina
IVET	<i>In Vivo Expression Technology</i>
IVX	<i>In Vivo Expressed</i>
kb	Kilobases
Km	Kanamicina
LB	medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
mb	Megabases
miniTn5	Mini Trasposon5
MGAP	Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
MP	medio mínimo
AN	Agar Nutriente
ON	incubación durante la noche (<i>Over night</i>)
pb	pares de bases
PG	Poligalacturonasas
r3bv2	raza 3 biovar 2
RIVET	<i>Resolvase based In Vivo Expression Technology</i>
STM	<i>Signature Tagged Mutagenesis</i>
Sp	Espectinomicina
T3E	Efectores de tipo III
Tc	Tetraciclina
TTSS	sistema de secreción de tipo III
TZC	cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
VBNC	viable pero no cultivable (<i>Viable But Not Culturable</i>)
WT	cepa silvestre (<i>wild type</i>)
X - Gluc	5 - bromo - 4 cloro - 3 indolyl - β - D- galactopiranosido
X - Gal	5 - bromo - 4 cloro - 3 indolyl - β - D- ácido glucurónico

Generalidades sobre *Ralstonia solanacearum* y la estrategia RIVET.

1.1. *Ralstonia solanacearum*: agente causal de la marchera de la papa.

En 1896, Erwin Frink Smith estableció a *Bacillus solanacearum* como el agente causal del marchitamiento bacteriano de la papa, el tomate y la berenjena. Este microorganismo, que en la actualidad recibe el nombre de *Ralstonia solanacearum*, está presente en todos los continentes y tiene la capacidad de enfermar a una gran cantidad de cultivos de importancia económica y nutricional, por lo que se considera que es una de las bacterias fitopatógenas que tiene mayor impacto económico en el mundo entero (Schell, 2000; Mansfield *et al.*, 2012).

En Uruguay afecta sobre todo a la papa, que es uno de nuestros principales cultivos hortofrutícolas. La enfermedad, también conocida como pudrición parda o marchera, produce daños sobre el follaje y los tubérculos y es una enfermedad de importancia mundial sobre el cultivo de papa. Llega a ser endémica tanto en regiones tropicales, como subtropicales y templadas. En América Latina la bacteria se encuentra muy extendida (Hayward, 1991).

El hecho de que esta bacteria tenga un gran rango de hospederos y una amplia distribución geográfica se ve agravado pues las estrategias de control son limitadas. Estas apuntan más que nada a la prevención, recomendando la rotación de cultivos en campos infectados, el secado del suelo, el tratamiento de la papa semilla con radiaciones, el uso de material

vegetal libre del patógeno y la limpieza de herramientas de cultivo o la aplicación de otros microorganismos como agentes de biocontrol, en tanto se busca generar cultivares resistentes (van Elsas *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2014; Wang y Liang, 2014). Por el momento, las medidas de control no son completamente efectivas contra el patógeno.

El primer brote de marchera de papa en nuestro país fue registrado en 1974 y su impacto fue devastador (Canale, 1983). Un segundo brote importante ocurrió en la zafra 2001-2002 cuando, según la Dirección de Estadísticas Agropecuarias del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DIEA – MGAP), el 34% de los predios sembrados fueron afectados. La incidencia de la enfermedad en el país ocurre en todas las zonas paperas y suele oscilar de año en año. Según la última encuesta papera que evaluó marchera, en la cosecha de primavera 2007 los daños por marchera significaron la pérdida de 323 toneladas (DIEA – MGAP, 2008).

1.2. Características generales de *Ralstonia solanacearum*.

1.2.1. Clasificación de *R. solanacearum*: un complejo de especies.

Desde el punto de vista taxonómico, *R. solanacearum* es un bacilo Gram negativo aerobio, perteneciente a la subdivisión β de la clase Proteobacteria. Desde que fue aislado por primera vez hasta la actualidad, la ubicación taxonómica de este microorganismo ha sufrido variantes. Durante 50 años fue llamado *Pseudomonas solanacearum* (Palleroni *et al.*, 1971; Palleroni, 2003). En la década de los '90, Yabuuchi *et al.* (1992) propusieron ubicarlo en el género *Burkholderia*, pero algunos años después, el mismo grupo de investigación sugirió crear un nuevo género, *Ralstonia* y re ubicarlo en este (Yabuuchi *et al.*, 1995; IJSB -List Nro.

57, 1996). Estos cambios se basaron en el análisis de ácidos grasos, el porcentaje de hibridación ADN-ADN y el análisis de secuencias de ARNr 16S, entre otros (Seal *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Poussier *et al.*, 2000).

Se considera que las cepas de *R. solanacearum* constituyen un complejo de especies altamente heterogéneo que agrupa cepas que varían en virulencia, rango de hospedero, modos de transmisión y propiedades metabólicas (Genin y Denny, 2012). Históricamente se estableció un sistema de clasificación de cepas clásico que busca reflejar las variantes fenotípicas y que se basa en dos aproximaciones: una que establece razas, enfatizando la afinidad del patógeno por distintos hospederos y otra que se basa en propiedades bioquímicas para separar las cepas en biovares. Hasta el presente se han descrito cinco razas (Buddenhagen *et al.*, 1962; He *et al.*, 1983) y seis biovariedades (Hayward *et al.*, 1964; 1991; 1994). Pese a que no hay acuerdos entre estos dos esquemas clásicos, las cepas del biovar 2 suelen pertenecer a la raza 3, que es la raza que afecta a los cultivos de papa en climas templados (Hayward, 1991) y la que está presente principalmente en Uruguay.

El sistema de clasificación clásica coexiste con un sistema de clasificación elaborado con criterios moleculares, que se ha desarrollado en los últimos años y que se basa en estudios genéticos sucesivos y concordantes entre sí (Cook *et al.*, 1989; Seal *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996; Poussier *et al.*, 2000). Logra reflejar mejor la excepcional diversidad de esta bacteria y tiene en cuenta sus aspectos evolutivos y sus orígenes geográficos. Se adoptan los criterios de clasificación jerárquica de Fegan y Prior (2005) en el que las distintas cepas de *R. solanacearum* pueden ser subdivididas en 4 grupos principales o filotipos definidos por análisis filogenéticos de las secuencias de la región ITS (*internal transcribed spacer*), del gen *hrpB* y del gen de la endoglucanasa, entre otros.

Cada filotipo está conformado por un conjunto de secuevares, los cuales a su vez, están compuestos por diferentes líneas clonales que pueden ser identificadas mediante técnicas de *fingerprinting*. El filotipo I está compuesto por cepas aisladas principalmente en Asia y que pertenecen a los biovares 3, 4 y 5. El filotipo II incluye cepas pertenecientes a los biovares 1, 2A y 2T, aisladas en su mayoría de América. En este filotipo se encuentran las cepas de *R. solanacearum* causantes de la marchera de la papa (raza 3/biovar 2) así como las cepas raza 2 patógenas de banana. El filotipo III contiene cepas originarias de África pertenecientes a los biovares 1 y 2T. Finalmente, el filotipo IV está compuesto por cepas aisladas en Indonesia (biovariedades 1, 2A y 2T) incluyendo también cepas de otras especies emparentadas a *R. solanacearum* (*P. syzygii* y BDB: blood disease bacterium).

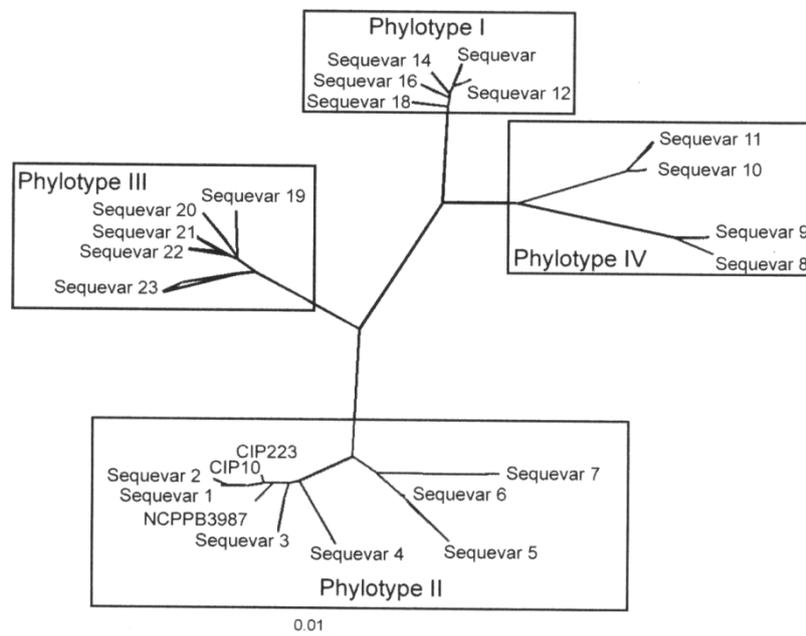


Figura 1.1. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias parciales de la endoglucanasa: refleja las relaciones filogenéticas de los secuevares y los filotipos. La barra indica el cambio de un nucleótido cada 100 posiciones nucleotídicas Tomado de Fegan y Prior (2005).

En los últimos años, en base a estudios de hibridación comparativa de genomas por *microarrays* (CGH), se ha vuelto a proponer una nueva reclasificación en la que las cepas del complejo de especies de *R. solanacearum* se dividen en tres nuevas especies (Remenant *et al.*, 2010), lo cual ha sido contemplado en tanto se escribe este manuscrito por el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (*International Committee on Systematic Bacteriology*, Safni *et al.*, 2014).

1.2.2. Características generales del genoma de *R. solanacearum*: excepcionalmente diversa.

En el año 2002 se secuenció por primera vez el genoma entero de una cepa de *R. solanacearum*, la cepa GMI1000, perteneciente al filotipo I/secuevar 12 (raza 1/biovar 3), aislada de plantas de tomate (Salanoubat *et al.*, 2002). Se estableció que el genoma de este microorganismo está organizado en dos replicones circulares de 3.7 y 2.1 megabases (Mb), conocidos respectivamente como cromosoma y megaplásmido, dando un genoma de un tamaño total de 5.8 Mb.

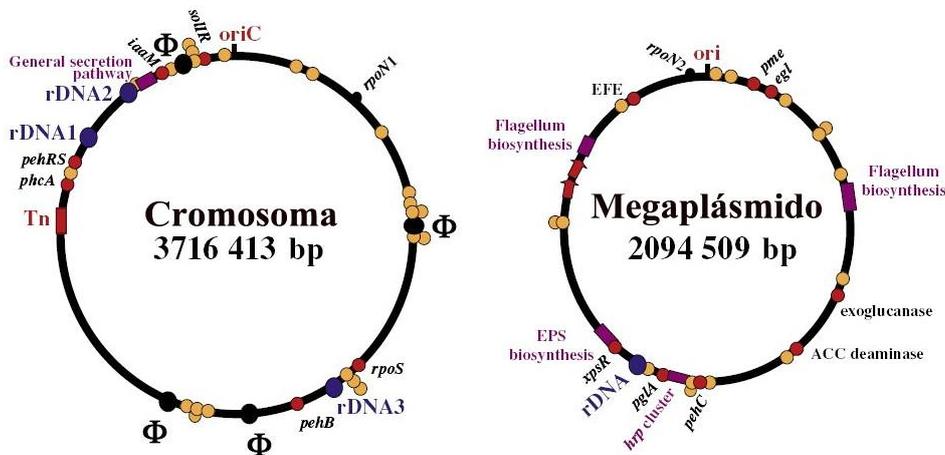


Figura 1.2. Organización del genoma de la cepa GMI100 de *Ralstonia solanacearum*. Se observa la organización bipartita del genoma. Tomado de Genin y Boucher (2002).

R. solanacearum GMI1000 es uno de los primeros microorganismos en el cual se documentó la organización bipartita. Esta organización específica se da no sólo en esta cepa particular sino que también parece ser una característica general de *R. solanacearum*, ya que la presencia del megaplásmido se ha establecido en la mayoría de las cepas de esta especie (Genin y Boucher, 2004). Las dos moléculas tienen un contenido G+C similar (67.04 % y 66.86% para el cromosoma y para el megaplásmido, respectivamente). El origen de replicación del cromosoma tiene las características del origen de replicación cromosómico propio del dominio Bacteria, en tanto el origen de replicación del megaplásmido tiene las características del *loci ori* plasmídico. No obstante, el megaplásmido presenta características de cromosoma debido a la presencia de genes ribosomales (Bentley y Parkhill, 2004).

Aunque en el megaplásmido se encuentra un número importante de genes de función desconocida de *R. solanacearum*, las características que conocemos hasta ahora permiten concluir que el replicón tiene una función significativa en la adaptación de la bacteria a varias condiciones ambientales (Salanoubat *et al.*, 2002; Genin y Boucher, 2004).

Posteriormente se secuenciaron cepas que correspondieran a los distintos filotipos: Molk2 (filotipo IIB, patógena de banana), IPO 1609 y UW551 (filotipo II, patógenas de papa), CFBP2957 (filotipo IIA), CMR15 (filotipo III) and PSI07 (filotipo IV) (Gabriel *et al.*, 2006; Remenant *et al.*, 2010). Pese a que las secuencias no están completamente anotadas, los resultados preliminares indican que sólo el 28% de los genes están conservados en todas las cepas secuenciadas, lo cual pone una vez más en relieve la heterogenicidad del pangenoma de este complejo de especies. En los últimos años se han continuado secuenciando cepas, en búsqueda de nuevos determinantes de patogenicidad y factores de especificidad de hospedero, por lo que en la actualidad se cuenta con más de 10 genomas secuenciados (Genin y Denny, 2012).

1.2.3. Características del hospedero y distribución geográfica del patógeno.

La amplia distribución geográfica y el extenso rango de hospederos de *R. solanacearum* son dos propiedades importantes de esta bacteria que explican las grandes pérdidas económicas que provoca. El rango de hospederos es inusualmente amplio. Se observan más de 400 especies pertenecientes a unas 50 familias de plantas, susceptibles al patógeno. Se incluyen no solo solanáceas (como papa, tomate, tabaco y berenjena) sino también algunas leguminosas (arvejas), unas pocas monocotiledóneas (sobre todo bananas y jengibre) y varios árboles y arbustos (como moras, olivos y eucaliptus). Los arbustos y hospederos asintomáticos juegan un rol en la supervivencia y persistencia de *R. solanacearum* (Hayward, 1991; Genin y Boucher, 2002).

Hay varias incogruencias aparentes en la distribución del marchitamiento bacteriano en ciertos hospederos. Por ejemplo la frutilla, que en el sureste de Estados Unidos es extensamente cultivada, no constituye un hospedero, pero sí se ve afectada por el fitopatógeno en Japón y Taiwán. Estos hospederos podrían ser susceptibles solamente cuando coinciden un número de factores ambientales como la temperatura, las lluvias, el tipo de suelo, el inóculo y otros factores biológicos del suelo como las poblaciones de nematodos, aunque también podría explicarse por la diversidad del patógeno, ya que no son las mismas cepas las que predominan en Asia que en América (Hayward, 1991).

Con respecto a la distribución de la bacteria, *R. solanacearum* es endémica en la mayoría de las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo. Como se indicó en el inciso 1.2.2, hay una correlación entre los filotipos y los orígenes geográficos. Si relacionamos la clasificación clásica con la presencia en el mundo, en general, el biovar 1 predomina en América y el biovar 3 en Asia. Por otro lado, el biovar 1 está ausente en la mayor parte de

Asia y nunca se ha encontrado en Australia. Los biovares 2, 3 y 4 también están presentes en Asia. El biovar 2, que presuntamente se originó en América del Sur, está ampliamente distribuido en todo el mundo. Se lo encuentra en muchos países del sur de Europa, en el área del Mediterráneo y en Argentina, Chile y Uruguay (Hayward, 1991; Horita y Tsuchiya, 2001).

Nuestro país no escapa a la realidad mundial. De acuerdo a los informes llevados a cabo por DIEA-MGAP en el otoño de 2006, la bacteria (raza 3, biovar 2) se encuentra presente en las zonas en las que predominan los cultivos paperos de Uruguay.

1.2.4. Ciclo de infección.

El modo de invasión de *R. solanacearum* GM11000 fue estudiado inicialmente por Vasse *et al.* (1995) en plantas de tomate crecidas hidropónicamente. Se vio que *R. solanacearum* se une primero a la superficie radicular formando microcolonias, especialmente en las zonas de elongación radicular y en los sitios de emergencia lateral de las raíces. Esto posiblemente se deba a que en esos sitios la barrera epidérmica de la raíz está debilitada y a que es una zona rica en exudados radiculares.

Las plantas exudan diversos azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y metabolitos secundarios, los cuales pueden actuar como quimioatrayentes para las bacterias que se asocian a las plantas. Pese a que el rol de la quimiotaxis no se conoce con exactitud, *R. solanacearum* presenta un sistema quimiotáctico complejo y efectivo. El comportamiento de la cepa *wild type* (WT) K60 fue testado *in vitro* frente a varios compuestos químicos que suelen estar presentes en los exudados radiculares de la planta de tomate, observándose una respuesta quimiotáctica muy fuerte para la mayoría de

los compuestos. También se observó que el exudado radicular del tomate, que es una planta hospedera, era más atractivo para la bacteria que el del arroz, que no constituye un hospedero. Distintas cepas de *R. solanacearum* responden en forma diversa cuando son enfrentadas *in vitro* a ocho carbohidratos que se encuentran habitualmente en los exudados radiculares. Esto puede estar relacionado con la adaptación de las cepas a los distintos hospederos o condiciones climáticas: *R. solanacearum* usaría su sistema de quimiotaxis para encontrar las raíces de un potencial hospedero, posiblemente con cierto grado de selectividad, y dirigirse hacia él (Yao y Allen, 2006).

R. solanacearum se movería por quimiotaxis desde la rizósfera hasta las raíces del hospedero, y desde allí hasta el xilema, por movilidad tipo *swimming* mediada por flagelo.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) también estaría involucrado en la adherencia inicial a las raíces, aparentemente porque interactuaría con las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina de las paredes celulares de la planta mediante interacciones carga – carga (Sequeira, 1985).

Una vez que se ubica en los puntos de infección (o también a partir de heridas), *R. solanacearum* invade en menos de 4 horas los espacios intercelulares del córtex radicular. Luego de 2-3 días se observa la colonización del espacio intercelular del cortex interno y del parénquima vascular de la raíz. Sin embargo, para lograr esto es necesario que la bacteria atraviese la barrera endodérmica suberizada de la raíz y por ello sería preferencial el ingreso de *R. solanacearum* por puntos donde la barrera está comprometida.

Luego de 4 o 5 días, la bacteria se acumula y rompe los vasos del xilema, penetrándolos (Figura 1.3). Esto puede lograrlo por la acción facilitada de sus enzimas pectinolíticas y celulolíticas sobre las paredes de los vasos.

Aparentemente, una vez que el patógeno alcanza el sistema vascular de los tallos, dejaría de expresar los genes de movilidad. Los mutantes aflagelados causan menor enfermedad en

plantas de tomate cuando son inoculados en suelo, pero si son inoculados directamente en el sistema vascular del hospedero no se observan diferencias con respecto a la virulencia de las cepas *wild type*. Esto demuestra que la movilidad tipo *swimming* es necesaria para la virulencia completa en *R. solanacearum* y que su contribución a la virulencia se da en las etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad, antes de que la bacteria alcance el tallo (Tans-Kersten et al., 2001).

Además de la movilidad tipo *swimming*, *R. solanacearum* presenta movilidad tipo *twitching*, que es una forma de translocación de la bacteria sobre superficies sólidas, independiente de flagelo y está mediada por la extensión y retracción de un pili de tipo VI o Tfp (Liu et al., 2001). Tfp está compuesto por una única pilina que se ensambla en un filamento que suele tener unos 6 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de largo. La movilidad tipo *twitching* favorecería la colonización de las raíces, su invasión, el desarrollo de biofilms y los movimientos dentro de los vasos del xilema. Además de su rol en la movilidad tipo *twitching*, el pili promueve la virulencia en las plantas de tomate y la adherencia a varias superficies (Kang et al., 2002; Siri et al., 2014).

Una vez que la bacteria entra en los vasos del xilema, puede moverse rápidamente a las partes superiores de la planta de tomate. Tras unos 6 días, las células de *R. solanacearum* pueden ser detectadas a través del tallo y para el octavo día se observan poblaciones superiores a 10^9 células por cm de tallo.

Se cree que los síntomas de marchitez que provoca en el hospedero se deben a la gran producción de exopolisacárido bacteriano, que bloquearía en forma mecánica el flujo de agua en la planta (McGarvey et al., 1999; Milling et al., 2011). Además, recientemente se ha postulado que la bacteria reconfiguraría el metabolismo de la planta para inducir la producción de aminoácidos requeridos para su crecimiento (Zuluaga et al., 2013).

Finalmente, las plantas se marchitan y mueren rápidamente, por lo que la bacteria es nuevamente liberada al suelo (Schell, 2000). Persisten en el ambiente hasta que encuentran otro hospedero disponible.

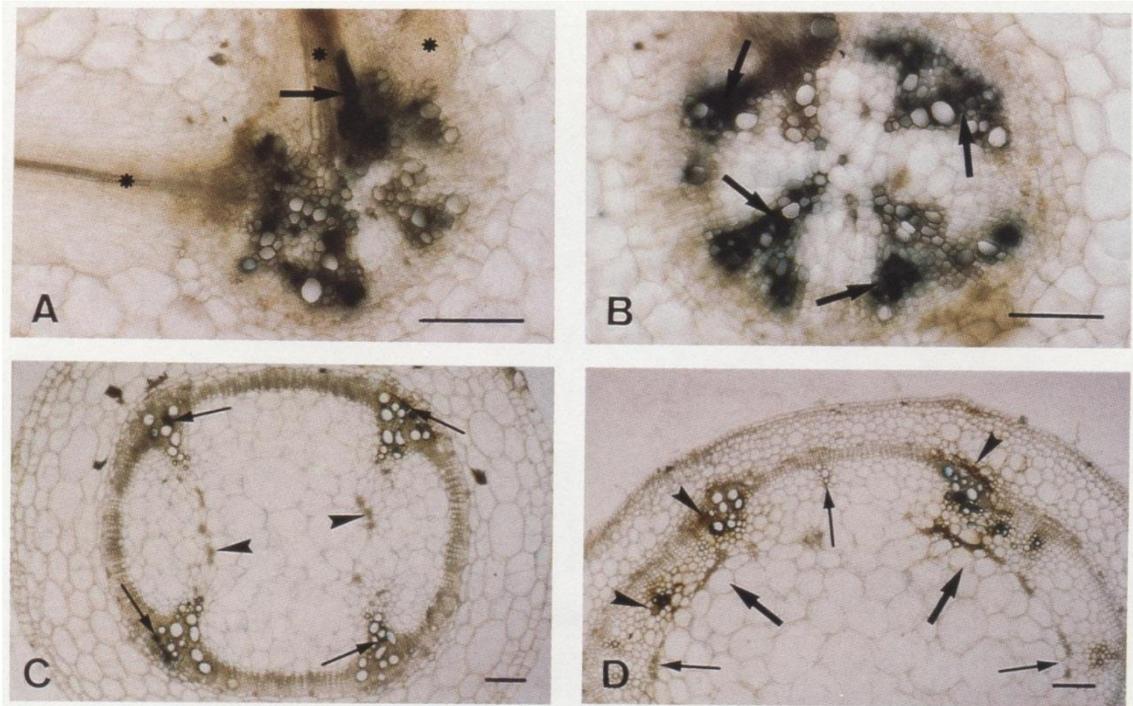


Figura 1.3. Colonización vascular a distintos niveles de una planta de tomate parcialmente marchita. Los cortes transversales se obtienen de la misma planta tras tinción histoquímica de la actividad de β - galactosidasa en la planta. **A:** Parte superior de la raíz principal. Aproximadamente el 20 % de los vasos del xilema están colonizados. Con la flecha se indica un vaso de xilema invadido en la base de una de las tres raíces secundarias (señaladas con asterisco). **B:** Parte mas baja del hypocotilo. Las flechas señalan cuatro haces vasculares distintos, cada uno conteniendo numerosos vasos colonizados. **C:** Parte aérea del hypocotilo con floema interno (cabezas de flechas). Los cuatro haces del xilema primario muestran vasos colonizados (flechas). **D:** Epicotilo. La colonización bacteriana se ve en los grandes haces vasculares (flechas gruesas), pero no en los pequeños haces alternativos (flechas delgadas). Se observan células amarronadas en la vecindad de las vesículas invadidas. Escala de la barra, 250 μ m. Tomado de Vasse *et al.* (1995).

R. solanacearum es capaz de sobrevivir por largos períodos en ausencia de plantas hospederas. Para esta propiedad se han propuesto distintas explicaciones: por un lado, la bacteria puede asociarse a los rastros de las plantas o a distintos hospederos asintomáticos. Se observó que cepas de *R. solanacearum* estudiadas en Europa pueden

sobrevivir en cursos de agua y en las raíces del arbusto *Solanum dulcamara* (Genin y Boucher, 2002).

Por otro lado, *R. solanacearum* podría sobrevivir por largos períodos de tiempo en las porciones más profundas del suelo, que es un ambiente pobre en nutrientes, bajo un estado conocido como “viable pero no cultivable” (*Viable But Not Culturable*, VBNC). Este estado puede ser considerado un período de dormancia que actúa como un mecanismo de supervivencia para algunas bacterias no formadoras de esporas. Aparentemente, cuando los tejidos de la planta hospedera se necrosan, el fitopatógeno responde a la disminución de la disponibilidad de nutrientes entrando en estado VBNC y este estado revierte cuando el microorganismo se enfrenta a un nuevo hospedero (Grey y Steck, 2001).

1.3. Factores de virulencia de *Ralstonia solanacearum*.

Debido a las importantes pérdidas económicas que genera *R. solanacearum*, varios grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en conocer los factores de virulencia implicados en la infección al hospedero y dilucidar sus mecanismos de acción, con el objetivo de generar conocimiento que permita avanzar en las estrategias de control. La capacidad de causar enfermedad de la bacteria está determinada por una compleja interacción entre distintos productos génicos que contribuyen en mayor o menor grado a su habilidad para persistir y multiplicarse. Se han descrito numerosos factores de virulencia y de patogenicidad requeridos para infectar exitosamente a su hospedero. En esta sección se analizarán los principales factores de patogenicidad de *R. solanacearum* que han sido identificados hasta el momento y su rol durante la patogénesis de la planta.

1.3.1. Productos extracelulares.

Exopolisacárido: Todas las cepas *wild type* de *R. solanacearum* producen grandes cantidades de exopolisacárido. El exopolisacárido (EPS) fue uno de los primeros factores de virulencia en ser estudiado. En la década de 1940 se observó que existía una correlación entre la presencia de EPS y la virulencia (Denny, 2005). El polisacárido producido por el fitopatógeno es altamente complejo, no sólo por su heterogeneidad sino también por la naturaleza de sus componentes. El EPS en la cepa GMI1000, está compuesto por dos fracciones: un polisacárido ácido de alto peso molecular, que se conoce como exopolisacárido I (EPS I) y una fracción cuya estructura no es un carbohidrato (Boucher *et al.*, 1992). Se considera que EPS I es uno de los principales factores de virulencia de *R. solanacearum* (Schell, 2000). El EPS I fue químicamente caracterizado en 1991 por Orgambide *et al.* y consiste en un largo polímero, con un peso mayor a 106 Da y con una unidad de repetición trimérica formada por N-acetil galactosamina, 2-N-acetil-2-desoxi-L-acido galacturónico y 2-N-acetil-4-N-(3-hidroxi-butanoil)-2-4-6-tridesoxi-D-glucosa. En un estudio en el que se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para EPS I, se observó que muchos aislamientos de *R. solanacearum* producen EPS I o un polímero similar, aunque podría haber variaciones entre las distintas cepas (Drigues *et al.* 1985; Boucher *et al.* 1992; Schell, 2000; Milling *et al.*, 2011). El EPS I es la fracción mayoritaria del EPS: si bien el 85% del EPS I existe como un mucus liberada de la célula, el 15% restante permanece unido a la superficie de la bacteria en forma capsular (Schell, 2000).

Debido a que el EPS I consiste en una matriz pericelular de carácter aniónico, hidratada y altamente polimerizada, se le han asignado varios roles mecánicos: se postula que protegería a la bacteria de la desecación y de la agresión de moléculas hidrofóbicas tóxicas

(Orgambide *et al.*, 1991). La bacteria, al diseminarse por la planta, excretaría grandes cantidades de EPS, lo cual provocaría la oclusión de los vasos vegetales al interferir con el transporte de agua y la rotura de los elementos vasculares debido a un exceso de presión hidrostática. Esto conduciría al marchitamiento de la planta (Drigues *et al.*, 1985; Denny, 2005). También se ha postulado que podría tener algún rol en la unión a la raíz, pero deberán realizarse experimentos adicionales para demostrarlo (Dalsing y Allen, 2014).

Lipopolisacárido: Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes de la superficie celular de las bacterias Gram negativas que están asociados a la membrana externa de la envoltura celular. El LPS es una molécula tripartita que consiste en un lípido, un núcleo oligosacárido y un O-polisacárido. El lípido, llamado lípido A, está ubicado en la monocapa externa de la membrana externa (Erbs y Newman, 2003). En *R. solanacearum*, el núcleo oligosacárido está compuesto de ramnosa, glucosa, heptosa y 2-ceto deosxi octonato. El O-polisacárido, distal al lípido A, está formado por ramnosa, N-acetilglucosamina y xilosa en proporciones 4:1:1 (Baker *et al.*, 1984). En relación al rol de LPS en la patogénesis, se cree que podría impedir la entrada de sustancias antimicrobianas de origen vegetal a la bacteria (Titarenko *et al.*, 1997). También participaría de la interacción celular con la superficie de las células vegetales, podría estar relacionado con la inducción de la respuesta de hipersensibilidad en plantas no hospedadas y permitiría la proliferación en los sitios de infección (Erbs y Neman, 2003, Li *et al.*, 2014).

Exoproteínas: Otros factores de virulencia que han sido bien caracterizados son las proteínas extracelulares. Estas enzimas actúan en conjunto para degradar las paredes celulares de la planta. Facilitan la invasión bacteriana y su proliferación al digerir las paredes de las células,

los geles pécticos que rodean los puntos de emergencia lateral de las raíces y las membranas perforadas que separan los vasos del xilema que se encuentran adyacentes. Posiblemente la degradación enzimática de las paredes celulares sea la responsable de los geles y la tilosis que se encuentra en forma típica en los vasos de las plantas marchitas. Además, estas enzimas liberan nutrientes que posibilitan la rápida multiplicación bacteriana. Este conjunto de enzimas extracelulares degradadoras de las paredes celulares se puede subdividir en enzimas pectinolíticas y enzimas celulolíticas (Tans-Kerseten *et al.*, 1998).

Con respecto a las enzimas pectinolíticas, *R. solanacearum* no sintetiza ninguna enzima que hidrolice pectina directamente pero produce tres poligalactouronidasas (PG): una endo-PG, PehA, de 52 KDa; una exo-poli- α -D-galactouronidasa, PehB, de 74 KDa y una exo-PG, PehC. La endo-PG PehA escinde al polímero péctico internamente, liberando trímeros y largos oligómeros de ácido galacturónico. Las exo-PG cortan al polímero péctico al azar: PehB actúa sobre los extremos no reductores de la pectina y libera ácido galacturónico en forma de dímeros y monómeros; PehC genera solamente monómeros a partir del mismo sustrato. Las PGs no pueden atacar las pectinas altamente metiladas, por lo cual los grupos metilos deben ser removidos del sustrato pectínico antes del corte hidrolítico. *R. solanacearum* produce una metilesterasa, Pme, de 42 KDa, que escinde los grupos metoxil de la pectina metilada, permitiendo así que quede susceptible a la acción de PGs (Tans-Kerseten *et al.*, 1998; Huang y Allen, 1997; Schell, 2000; González y Allen, 2003).

En relación a las enzimas degradadoras de celulosa, *R. solanacearum* produce dos glucanasas extracelulares que pueden atacar el enlace glicosídico β -1-4 de la celulosa. Egl es una enzima de 43 kDa con actividad β -1-4-endoglucanasa que libera celobiosa, celotriosa y celotetraosa a partir de celulosa soluble. Se cree que Egl facilita la invasión de raíces y la penetración a los

vasos del xilema al degradar los glucanos celulósicos de las paredes celulares vegetales (Schell, 1987; Schell, 2000).

Una enzima extracelular adicional, cuyo rol estaría involucrado en la degradación de paredes celulares es la celobiohidrolasa CbhA. Si bien aún no ha sido extensamente caracterizada, se presume que se trata de una proteína de 561 aminoácidos con actividad 1,4- β -celobiohidrolasa, que liberaría celobiosa a partir de los extremos no reductores de 1,4- β -D-glucanos (Liu *et al.*, 2005).

Las enzimas extracelulares se pueden considerar factores de virulencia cuantitativos, ya que cada una agrega un grado de agresividad al patógeno, y en conjunto, son requeridas para la virulencia completa, aunque cada una de ellas, de forma individual, puede no ser esencial para la patogenicidad.

1.3.2. El sistema de secreción de tipo III.

El sistema de secreción Tipo III (TTSS) es una vía de exportación empleada por numerosas bacterias Gram negativas patógenas y simbiotes para inyectar proteínas efectoras directamente en el citoplasma de las células hospederas. Los sustratos del TTSS son sintetizados en el citoplasma de la bacteria y son traslocados a la célula eucariota mediante una nanomaquinaria que atraviesa las membranas bacterianas y las del hospedero, en un proceso de un solo paso (Mota *et al.*, 2005). En los fitopatógenos, el TTSS está codificado por el *cluster* de genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*: reacción de hipersensibilidad y patogenicidad). Actúa causando la enfermedad en plantas susceptibles y disparando la reacción de hipersensibilidad en plantas resistentes. Los *clusters hrp* comprenden entre 20 y 25 genes, organizados en varias unidades transcripcionales. De

acuerdo a su organización genética y a su regulación, pueden ser clasificados en dos grupos: el grupo I, que comprende los *clusters hrp* de *Pseudomonas syringae* y de distintas Enterobacterias fitopatógenas y el grupo II que incluye a *Ralstonia solanacearum* y a distintas especies de *Xanthomonas* (Van Gigsejem *et al.*, 2002) y *Acidovorax* (Burdman y Walcott, 2012). La inyección de proteínas efectoras en las células vegetales está mediada por una estructura ensamblada por el TTSS, llamada pilus Hrp, que actúa como un conducto (Jin y He, 2001). Una vez introducidas dentro de la célula eucariota, las moléculas efectoras promueven la enfermedad interfiriendo con las vías de señalización celular vegetal o suprimiendo las defensas de inmunidad innata de la planta (Grant *et al.*, 2006). Por estos motivos son consideradas el principal determinante de patogenicidad y de rango de hospedero (Cunnac *et al.*, 2004 A).

El cluster hrp de *Ralstonia solanacearum*: El *cluster hrp* de *R. solanacearum* (Figura 1.4.) tiene un tamaño de 23 kb y está localizado en el megaplásmido, posiblemente dentro de una isla de patogenicidad. La inactivación de cualquiera de los más de 20 genes que componen el *cluster hrp* provoca que *R. solanacearum* pierda la habilidad de causar enfermedad, multiplicarse en las plantas susceptibles y de disparar la respuesta de hipersensibilidad en las plantas resistentes, lo cual está en concordancia con el comportamiento de otros *clusters hrp* estudiados en bacterias fitopatógenas (Schell, 2000). En todos los TTSS conocidos hasta la actualidad, ya sean de patógenos animales o vegetales, existen nueve proteínas que se encuentran conservadas. En fitopatógenos, los genes que codifican para estas proteínas se han renombrado como *hrc* (*hrp conserved* o *hrp conservados*) y mantienen la designación de la última letra de acuerdo a sus homólogos *ysc* en *Yersinia*: *hrcC*, *hrcJ*, *hrcN*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU* y *hrcV*. El *cluster hrp* es un mosaico de genes que se encuentra organizado en

siete unidades de transcripción y que codifica para genes *hrc*, genes regulatorios y para proteínas de excreción (Van Gijsegem *et al.*, 2002).

Ciertos genes cuyos productos afectan el fenotipo de la planta y que son secretados vía TTSS están físicamente cercanos y coregulados con el *cluster hrp*. Un ejemplo de esto es el operón *popABC*, que codifica para las proteínas de secreción PopA, PopB y PopC y que se ubica en el borde izquierdo externo al *cluster hrp* (Mukaihara *et al.*, 2004).

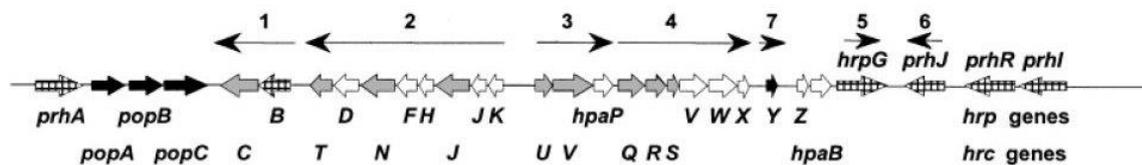


Figura 1.4: Organización genética del *cluster hrp* de *R. solanacearum*. Las flechas delgadas y numeradas indican las unidades de transcripción. Las flechas llenas indican los distintos genes: los genes conservados *hrc* se representan en gris; los genes que son secretados, en negro; los genes regulatorios, con rayas. Tomado de Van Gijsegem *et al.*, 2002.

El aparato de secreción Tipo III: Los genes *hrp/hrc* están involucrados en la biogénesis del aparato de secreción Tipo III, que permite la secreción de proteínas. El empleo de la técnica de microscopía electrónica de transmisión permitió observar los pili Hrp, que son filamentos flexibles, de 3-5 nm de ancho y 3 μ m de largo y que forman parte del aparato de secreción Tipo III. Presentan una subestructura helicoidal repetitiva, lo que indica que existe una subunidad base que se dispone en forma de hélice. El principal componente estructural del pilus Hrp es HrpY. Esta proteína se ensambla en exoestructuras que aparentemente se anclan primero a la superficie bacteriana y que luego se van desplegando hacia el ambiente. La secuencia de HrpY no está relacionada con la de ninguna otra pilina conocida. Trabajando con mutantes deficientes en esta proteína se observa que es esencial para establecer

interacciones con la planta y para secretar a PopA pero que no se requiere para la unión a las células vegetales (Van Gijsegem *et al.*, 2000).

Otros experimentos descritos en bibliografía en los que se emplean mutantes, señalan que las proteínas HrpF, HrpK, HrpW y HrpX son indispensables para la secreción de proteínas y para la interacción con plantas. Aparentemente tanto HrpX como HrpV serían necesarias para que HrpY se pueda ensamblar como un apéndice organizado. HrpX es una proteína de carácter predominantemente hidrofílico, lo que induce a pensar que podría o actuar en el periplasma de la bacteria o anclarse en la superficie bacteriana externa. Los genes *hrpD*, *hrpH*, *hrpJ*, *hpaP* y *hrpV* codificarían para proteínas que no son indispensables para desarrollar el aparato de secreción Tipo III, por lo que se estima que actuarían como proteínas auxiliares (Van Gijsegem *et al.*, 2002).

A partir de lo anterior se puede desarrollar un modelo del aparato de secreción Tipo III de *R. solanacearum* (Figura 1.5). Se presume que las proteínas Hrc, que son requeridas para la secreción, forman el core del aparato, posicionándose en la membrana interna de la bacteria. La proteína HrpW posee una hélice transmembrana, que se encuentra parcialmente expuesta hacia el espacio periplásmico; se especula que sería parte del complejo proteico de la membrana interna de la bacteria. Por analogía con el aparato de secreción Tipo III de *Pseudomonas syringae* y *Yersinia*, se presume que la secretina HrcC actuaría como porina en la membrana externa y que la lipoproteína HrcJ se localizaría en ambas membranas, formando un puente entre las partes del aparato que se ubican en la membrana interna y/o externa. La proteína HrcN es una ATPasa, por lo que proveería de la energía que se requiere para que se de la organización del aparato y/o para que éste lleve a cabo sus funciones. Todo este complejo permitiría la secreción de la proteína HrpY, que se ensambla para formar el pilus Hrp con la colaboración de HrpX y HrpV. Se demostró que el

pilus Hrp funciona como un conducto hueco a través del cual son secretadas las proteínas efectoras (Van Gijsegem *et al*, 2002). *R. solanacearum* es la única especie bacteriana en la que se ha vinculado la expresión del TTSS con el contacto físico con el hospedero (Brito *et al.*, 2002; Coll y Valls, 2013).

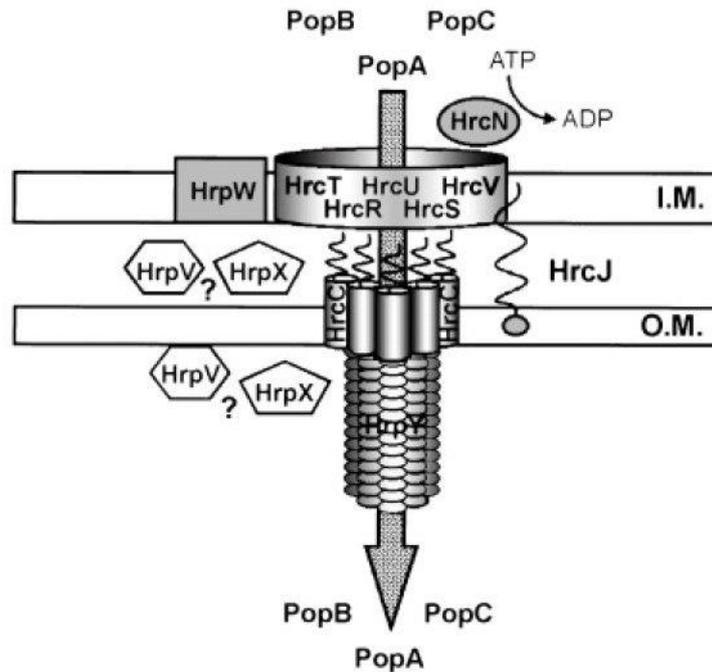


Figura 1.5. Modelo en el que se propone una organización estructural a las distintas proteínas Hrp en el ensamblaje del aparato de secreción Tipo III de *R. solanacearum*. Tomado de Van Gijsegem *et al*, (2002).

El regulón Hrp: La expresión de los genes *hrc*, *hrp* y de la mayoría de las proteínas efectoras que son secretadas por TTSS está regulada por dos vías principales que dependen de señales ambientales: una de ellas es el **sistema Prh**. La otra, está dada por el **sistema Phc** que incluye al regulador global de la virulencia PhcA.

El **sistema Prh** involucra al menos seis componentes que han sido descubiertos usando análisis de secuencias de ADN y genética reversa en regiones flanqueantes de genes estructurales *hrp*. Posiblemente el receptor de superficie sea PrhA, una proteína que

presenta similitud con los receptores de sideróforos TonB dependientes. La transducción de la señal de la planta desde PrhA hasta los promotores de los genes *hrp* involucra otros componentes: el activador transcripcional PrhJ y las proteínas PrhI y PrhR. El modelo actual (Figura 1.6) supone que PrhA transduce una señal desde la superficie de la célula vegetal al dominio periplásmico de la proteína de anclaje a la membrana interna: PrhR. Esta proteína, mediante su dominio citoplasmático, activa a PrhI, que es un factor sigma que activaría directamente la transcripción del gen *prhJ*. A continuación, PrhJ activa la transcripción del gen *hrpG*, que codifica para un activador transcripcional. El activador HrpG, que es el regulador central de la cascada, induce la expresión de HrpB, quién es en última instancia el responsable de activar los genes del regulón Hrp y de los efectores asociados (Schell, 2000).

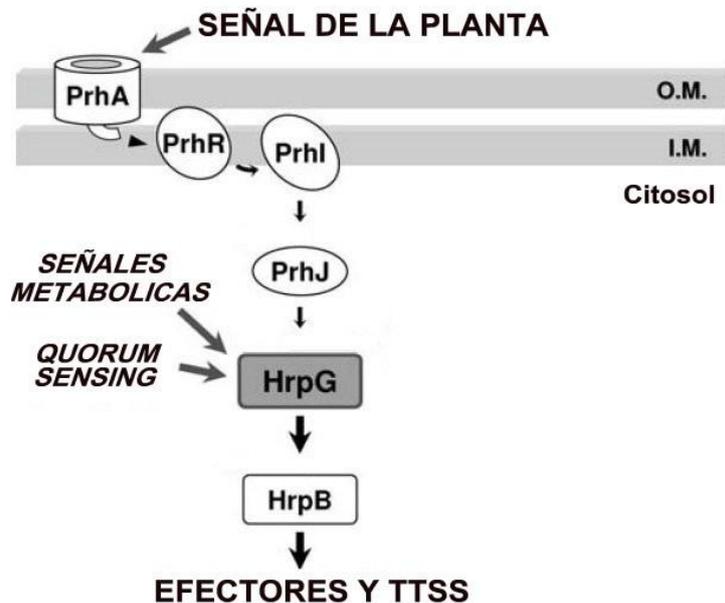


Figura 1.6. Modelo esquemático de la regulación en cascada de Hrp en *R. solanacearum*. Una señal de la planta es sensada por el receptor de membrana externa (*Outer Membrane* OM) PrhA y es transducida a PrhJ a través de PrhR/I. HrpG es un componente central en la vía ya que integra distintas señales y regula la expresión de los genes del aparato TTSS y de efectores a través de la activación de HrpB. PhcA y PrhG no se muestran en el esquema. Modificado de Valls *et al.* (2006).

HrpB, que es un activador transcripcional que pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC, es el responsable de activar los promotores del regulón Hrp, ya sea directamente o mediante un intermediario. Se especula que la activación transcripcional mediada por HrpB podría involucrar alguna molécula pequeña que actúe como coinductor, ya que las proteínas de la familia AraC suelen emplear coinductores para activar la transcripción de los genes que regulan. La expresión del gen *hrpB* sólo se induce cuando la bacteria se enfrenta a las células vegetales (Aldon *et al.*, 2000). Esto es esperable, ya que una de las funciones aparentes del TTSS es obligar a la planta a liberar nutrientes, inyectándole proteínas tóxicas a las células vegetales.

Una vez que la expresión del gen *hrpB* es activada, su producto HrpB deberá reconocer un elemento nucleotídico bipartito de 24 pb TTCGn16TTCG en los promotores de los genes que regula. Este elemento nucleotídico recibe el nombre de *hrp_{II} box*. El repertorio de genes transcripcionalmente activados por HrpB es muy amplio: induce la expresión de al menos 5 operones, entre los que se incluye el operón *popABC*. Existen además 95 genes en el genoma de *R. solanacearum* que presentan la *hrp_{II} box*, por lo que podría tratarse de potenciales efectores del TTSS regulados por HrpB (Cunnac *et al.*, 2004A; Cunnac *et al.*, 2004B). Sin embargo no todos los efectores que son secretados por TTSS están regulados por HrpB. Por ejemplo, la expresión de *popP1* es constitutiva (Lavie *et al.*, 2002).

Por otro lado, la observación de que los genes *hrp*, especialmente *hrpB*, son reprimidos *in vitro* cuando hay una alta densidad bacteriana o fuentes complejas de nutrientes (medio rico), permitió constatar que existe una **represión de TTSS mediada por PhcA**, a quién se lo considera el regulador global de la virulencia. PhcA controlaría la expresión de muchas actividades vinculadas con la virulencia, como la movilidad, la degradación de paredes celulares y la síntesis de exopolisacáridos (Genin *et al.*, 2005).

Existe un nivel adicional de control, que fue descrito por Plener *et al.* (2010): PrhG es un parólogo de HrpG e influye en la expresión del regulón HrpB.

De esta forma podemos asumir que HrpG y HrpB actúan como puntos clave de la regulación del TTSS, ya que reciben la señal de entrada de dos sistemas de regulación y las integran de forma tal de permitir la expresión ajustada de los genes *hrp* en respuesta a las condiciones ambientales (Genin *et al.*, 2005).

Proteínas secretadas por TTSS: A través de la maquinaria Hrp se translocan distintas clases de proteínas, desde la bacteria al citosol de la planta. Se cree que estos efectores perturban los procesos celulares del hospedero y modulan la inmunidad innata de la planta para permitir la infección bacteriana. La dilucidación del repertorio completo de efectores de Tipo III (T3E) ha sido uno de los puntos críticos en la agenda de investigación de *R. solanacearum*. El repertorio de T3E es variable entre las distintas cepas de esta bacteria y podría expresarse diferencialmente de acuerdo al hospedero al que enfrente (Peeters *et al.*, 2013).

Inicialmente se llevaron a cabo trabajos clásicos, en los que se hacía *knock out* de genes candidatos a ser T3E y se evaluaba su efecto en la patogenicidad, en tanto se catalogaba la estructura proteica dentro de familias de proteínas bien definidas. En ese contexto, en *R. solanacearum* se han identificado y caracterizado varios efectores secretados por el TTSS, como las proteínas PopP y las Rip.

El operón *popABC* se encuentra junto al *cluster hrp*. El gen *popA* codifica para el polipéptido PopA1, que es el precursor de la proteína PopA3. La conversión de PopA1 a PopA3 es un proceso que se da al menos en dos pasos y que implica al intermediario PopA2. La proteína resultante (PopA3) tiene un peso molecular de 23,5 kDa no presenta ni cisteína ni residuos

aromáticos y exhibe una proporción significativa de glicinas y alaninas. Tanto PopA1 como sus derivados son capaces de disparar la respuesta de hipersensibilidad en ciertas líneas de *Petunia* y en tabaco, pero no son esenciales para el desarrollo de la enfermedad (Arlat *et al.*, 1994). El producto del gen *popB* es una proteína pequeña y básica que presenta una señal de localización nuclear, por lo que podría estar destinada al núcleo eucariota. PopB no posee ningún dominio de unión al ADN pero sí una hélice en el extremo C-terminal. Esto sugiere que podría interactuar con otras proteínas. El tercer producto del operón es PopC, una proteína de 1024 aminoácidos que se caracteriza por poseer 22 repeticiones ricas en leucina (*leucine-rich repeat*, LRR) en tandem. Este motivo estructural se suele observar en familias de proteínas citoplasmáticas de eucariotas, lo que lleva a suponer que PopC sería traslocado al citoplasma de la célula vegetal, donde interactuaría con algunas proteínas diana de la planta. Varias proteínas vegetales con motivos LRR están involucradas en procesos de desarrollo y defensa de la planta, participando de las vías de señalización. Una hipótesis atractiva sobre el rol de PopC es que podría imitar a proteínas vegetales, modulando de esa forma cascadas de transducción de señales específicas, por ejemplo, interfiriendo con vías gobernadas por los genes de resistencia. Otra hipótesis alternativa es que PopC interactuaría con otros efectores de *R. solanacearum* de forma tal de evitar que sean reconocidas por las proteínas de resistencia de la planta (Guéneron *et al.*, 2000).

La proteína PopP1 es otro efector dependiente de TTSS. Fue aislada en la cepa GMI1000 de *R. solanacearum* y se comporta como un factor de avirulencia en *Petunia* St40. Al contrario que los genes *popA*, *popB* y *popC*, el gen *popP1* no se encuentra localizado en la proximidad del *cluster hrp* en el megaplásmido, sino que está ubicado en una región ACUR del cromosoma. PopP1 es una proteína de 44 kDa; tiene una tríada de aminoácidos característica de las cisteín-proteasas y su estructura está relacionada con la familia

YopJ/AvrRxv. En esta familia se encuentran los factores de patogenicidad de *Yersinia* YopP/YopJ y varias proteínas Avr de bacterias fitopatógenas (Lavie *et al.*, 2002). En la región en la que se encuentra el gen *popP1* se han identificado otros dos genes: *popP2* y *popP3* que también presentan características estructurales de las cisteín-proteasas. El gen *popP2* codifica para una proteína de 483 aminoácidos. Tiene una señal de localización nuclear en el extremo N-terminal que promovería su ingreso al núcleo de la célula vegetal una vez que ha sido translocada al citoplasma de la célula eucariota. PopP3, en cambio, exhibe un sitio de potencial miristilación en su extremo N-terminal, por lo que estaría dirigida a la membrana de la célula vegetal (Lavie *et al.*, 2004).

Otro grupo de proteínas efectoras que transitan por el TTSS son RipA, RipB, RipG y RipT. RipA parecería ser necesaria para la patogenicidad durante la infección de plantas de tomate. Tanto Rip A como RipG pertenecen a familias multigénicas (entre 5 – 7 genes) que son únicas de *R. solanacearum*. Rip G forma parte de una subclase de proteínas LRR a la que se le llama subfamilia “GALA”. Es claramente distinta a la proteína PopP2, que como se explicó anteriormente, presenta motivos LRR. RipT pertenece a la familia de las cisteín-proteasas YopP/J. Por último, la proteína RipB tiene un motivo estructural homólogo al de varias N-ribohidrolasas, por lo que promovería la hidrólisis de moléculas que contengan nucleósidos dentro de las células vegetales (Genin y Boucher, 2004; Cunnac *et al.*, 2004A).

Posteriormente se realizaron análisis de secuencias que permitieron buscar homología con efectores conocidos de otras especies y anotar nuevos efectores de tipo III (Salanoubat *et al.*, 2002). Este tipo de estudio pionero fue el puntapié inicial para llevar a cabo estudios masivos en búsqueda de T3E, ya fuera mediante análisis *in silico* o análisis funcionales. Como se mencionó en la sección anterior, muchos efectores se identificaron buscando la caja hrp_{II} (Cunnac *et al.*, 2004 A y B).

En otro estudio, desarrollado por Mukaihara *et al.* (2010), se realizó un *screening* funcional de efectores de tipo III. En este estudio se encontraron 72 genes candidatos que deberán ser caracterizados. Al igual que los estudios realizados sobre las enzimas extracelulares, pocas veces se ha visto un fenotipo claro de virulencia en *R. solanacearum* al mutar individualmente a los efectores de tipo III, reforzando la idea de que los efectores actúan como un colectivo en el que cada uno contribuye en un pequeño grado en el desarrollo de la enfermedad.

Estudios más recientes (Jacobs *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013) han permitido identificar efectores como PopS e IptC, que cumplen un rol crucial en la patogénesis y en la determinación de especificidad al hospedero.

Finalmente, un estudio sistemático y exhaustivo fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Genin (Peeters *et al.*, 2013), en el que se revisó toda la información existente sobre efectores de tipo III, se re clasificó y se llevó a cabo una unificación de la nomenclatura, vinculando los efectores descritos a los distintos filotipos de *R. solanacearum*.

A partir de los conocimientos que poseemos en la actualidad, está claro que el TTSS de *R. solanacearum* es una vía compleja y de gran importancia ya que permite la secreción de una inmensa cantidad de componentes efectores, que cumplen un rol vital en el desarrollo de la enfermedad.

1.3.3. Otros factores de virulencia.

Existen numerosos factores de virulencia adicionales que contribuyen en mayor o menor medida a que la bacteria enferme exitosamente al hospedero. Se citarán brevemente a algunos de ellos: por ejemplo, la enzima peroxidasa Bcp. Esta enzima es necesaria para la detoxificación del peróxido de hidrógeno derivado de la planta. Las cepas mutantes para el gen *bcp* muestran una virulencia marcadamente reducida en ensayos llevados a cabo en plantas de tomate y de tabaco. Se estima que *R. solanacearum* se enfrenta a un alto estrés oxidativo durante el proceso de infección de la planta y su capacidad de lidiar con las especies reactivas del oxígeno vegetales es crucial para infectar exitosamente al hospedero (Flores-Cruz y Allen, 2009).

La capacidad de moverse es muy importante en el proceso de colonización de la planta. *R. solanacearum* exhibe movilidad del tipo *swimming*, mediada por flagelos polares que suelen presentarse de uno a cuatro. Se ha observado que la bacteria no es móvil en el fluido del xilema a altas densidades celulares y que la movilidad se ve muy atenuada cuando la densidad celular es moderada. Para determinar la importancia de la movilidad en el desarrollo de la enfermedad se hicieron ensayos de virulencia en plantas de tomate empleando mutantes no móviles inoculados en el suelo. Bajo estas condiciones, los mutantes no móviles ocasionaron menor enfermedad que las cepas *wild type*, demostrando que la movilidad tipo *swimming* es un carácter necesario para que *R. solanacearum* sea completamente virulenta. Sin embargo la movilidad no es requerida una vez que el patógeno alcanza el sistema vascular del tallo, por lo que el flagelo hace su contribución a la virulencia antes que la bacteria alcance el tallo, en las etapas tempranas de la enfermedad. La movilidad tipo *swimming* está mediada por un flagelo, que es una estructura que consiste

en un filamento largo y helicoidal anclado en la envoltura celular mediante un gancho flexible y un complejo cuerpo basal. Estructuralmente, el flagelo se dispone como un tubo hueco que se compone de más de 20 mil copias de una proteína llamada flagelina (FliC). Esta se polimeriza como una hélice. La rotación del flagelo está controlada en el cuerpo basal por un motor flagelar compuesto por las proteínas FliG, FliM y FliN. Otras proteínas adicionales constituyen el cuerpo basal (Tans-Kersten *et al.*, 2001). La movilidad tipo *swimming* es necesaria para la quimiotaxis a través del suelo hacia los sitios de infección óptimos en las raíces de los hospederos, y desde allí a través del córtex para desarrollarse en el tejido del protoxilema. A medida que la enfermedad progresa, la movilidad puede ayudar al patógeno a propagarse por los vasos del xilema. El flagelo también contribuye a que la bacteria se una a las células del hospedero y a la formación de biofilms (Tans-Kersten *et al.*, 2001).

La presencia de movilidad tipo *twitching* fue reportada para *R. solanacearum* en 1975 por Henrichsen pero recién en estos últimos tiempos se comenzó a investigar más profundamente este fenómeno. La movilidad tipo *twitching* es una forma de translocación de la bacteria sobre superficies sólidas, independiente de flagelo y que da lugar al movimiento coordinado y continuo de las células. Requiere la presencia de pilus de tipo IV (Tfp), que son filamentos flexibles de 6 nm de diámetro y varios micrómetros de largo, compuestos por varias subunidades de una proteína llamada pilina. Se sintetiza a partir de una prepilina que posee un péptido líder N-terminal. La fuerza para mover a la célula se genera por la retracción de Tfp, mediada por el desensamblaje del filamento. Tfp es importante para la adhesión, la autoagregación, la formación de biofilms, la transferencia horizontal de genes y la virulencia (Kang *et al.*, 2002).

El gen *pilA* codifica para una prepilina de 173 aminoácidos. Los primeros 13 residuos son de carácter predominantemente básicos y preceden a una secuencia altamente conservada

entre las prepilinas, que es un sitio que reconoce una peptidasa que participa del proceso de maduración de la proteína. Se cree que existen más de treinta genes adicionales a *pilA* que están relacionados con la producción de Tfp. En *R. solanacearum* se han identificado tres que son esenciales para la biogénesis de Tfp: *pilD* y *pilQ*. El gen *pilD* codifica para una peptidasa que procesa la proteína prepilina y N-metila el aminoácido N-terminal. Por otro lado, el producto de *pilQ* es una secretina localizada en la membrana exterior y se cree que forma un canal por el que viajan las subunidades de pilina. Finalmente, el gen *pilT* codifica para una ATPasa que es requerida para la retracción de Tpf que acciona el movimiento celular. Dado que mutantes en los que se inactiva *pilQ* y *pilT* resultan menos virulentos que las cepas *wild type* en las etapas iniciales de la enfermedad, cuando son inoculados en plantas de tomate, se supone que Tfp cumple un rol importante en la invasión y colonización del hospedero. Posiblemente la migración sobre superficies mediada por Tfp promueva la adquisición de nutrientes, la colonización bacteriana de superficies radiculares, la migración hacia los sitios de entrada, la invasión de la raíz, el movimiento dentro de los vasos del xilema y la adherencia a superficies (Liu *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002, Siri *et al.*, 2013).

1.3.4. Consideraciones sobre los factores de virulencia.

Como se ha visto, *R. solanacearum* se enfrenta a una serie de desafíos a lo largo de su ciclo de vida, ya sea como patógeno o como saprófito. Debe ser capaz de sobrevivir en el suelo y realizar la transición a la fase patogénica, lo que implica la activación y represión de distintos genes para favorecer la multiplicación celular y la colonización. Una vez localizado en la rizósfera del hospedero, debe ser capaz de encontrar una herida o una abertura natural que le permita ingresar a la planta. Dentro del córtex radicular, el patógeno deberá multiplicarse

empleando los nutrientes disponibles y dirigirse a los vasos del protoxilema. Desde allí migra hacia los vasos del xilema, que por sí mismos constituyen un desafío particular ya que no es un ambiente rico desde el punto de vista nutricional; la presión interna es alta y el flujo de la transpiración puede impedir que las bacterias se adhieran a las paredes de los vasos. Para lograr el éxito como patógeno, *R. solanacearum* deberá modular la expresión de varios conjuntos de genes específicos que están implicados en la patogénesis.

Este fitopatógeno cuenta con un verdadero arsenal de factores de virulencia que le permiten enfermar a una gran variedad de hospederos. En forma individual, la mayoría de ellos afecta en forma leve al hospedero, pero tomados en conjunto actúan provocando la enfermedad y muerte de la planta. La regulación de dichos factores de virulencia, pese a que no ha sido aún totalmente dilucidada, muestra que *R. solanacearum* tiene un sistema regulatorio altamente sofisticado que enciende y apaga genes en forma coordinada de acuerdo a la etapa de la enfermedad en la que se encuentre, sensando el ambiente. Pese a toda la información que se ha acumulado sobre esta bacteria, aún no se conocen todos los mecanismos implicados en la patogenia ni en la determinación del rango de hospedero. Tampoco se han desarrollado métodos de control y prevención aplicables a los distintos hospederos y secuevares de la bacteria.

La secuenciación del genoma completo de *R. solanacearum* ha sido un hito muy importante ya que nos permite tener una idea de todos los genes presentes y predecir muchas de sus funciones bioquímicas.

Seguramente, cuando E. F. Smith estableció que *R. solanacearum* era el agente causal del marchitamiento bacteriano en solanáceas, no imaginó que 115 años después y pese a la gran cantidad de conocimientos generados por la comunidad científica, muchas de las

interrogantes establecidas inicialmente sobre el mecanismo de infección de este microorganismo seguirían vigentes.

Por estas razones, todo estudio orientado a generar conocimientos sobre los factores de virulencia de este fitopatógeno colaborará en nuestra comprensión de la interacción que se establece entre el patógeno y la planta y nos ayudará, en definitiva, a mejorar nuestra capacidad de prevenir y controlar la enfermedad.

1.4. Estudio de las interacciones planta-hospedero: IVET y RIVET.

La identificación y caracterización de los factores de virulencia nombrados anteriormente han sido el producto de rigurosos trabajos generados en los últimos años y han aportado una información invaluable sobre la fisiología y la genética de *R. solanacearum*. Sin embargo, las aproximaciones metodológicas llevadas a cabo para identificar estos genes se han realizado bajo condiciones de laboratorio bien definidas, que no suelen tener en cuenta las interacciones que se generan entre la planta y el patógeno. Dichas interacciones son de carácter dinámico y complejo y resultan extremadamente difíciles de reproducir *in vitro*. Todo esto va en detrimento de nuestra comprensión de la fisiología de la enfermedad y sesga la identificación de factores de virulencia que se expresan sutilmente sólo cuando los microorganismos se ven enfrentados al hospedero.

En los últimos años el abordaje experimental de la interacción planta - patógeno se ha beneficiado con el surgimiento de nuevas técnicas de estudio como la transcriptómica (RNA - seq), *microarrays* de expresión u otros abordajes que buscan caracterizar al patosistema en su conjunto: RNA-seq, *Signature-Tagged Mutagenesis* (STM), *In Vivo Expression Technology* (IVET) y sus variantes *Differential Fluorescence Induction* (DFI) y *Recombinase or resolvase-*

based IVET (RIVET). Todas ellas buscan identificar genes bacterianos que son activados en el hospedero y que no se expresan bajo las condiciones de crecimiento de laboratorio (Unsworth y Holden, 2000; Pradel y Ewbank, 2004; Osbourn *et al.*, 1987).

En *R. solanacearum*, la aplicación de este tipo de enfoques más globalizadores ha permitido observar que en la planta, el TTSS se expresa en etapas tempranas y tardías de la enfermedad (Monteiro *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2012 A; Jacobs *et al.*, 2012), lo cual se contrapone con los resultados obtenidos *in vitro* y remarca la importancia de apelar a abordajes que tomen al patógeno y al hospedero como un todo. En este tipo de estudios también se ha encontrado que muchos genes *housekeeping* se sobreexpresan o se co regulan con otros factores de patogenicidad, para mejorar la competencia de la bacteria en el hospedero (Tamir-Ariel *et al.*, 2007).

Como se estableció en el punto 1.3 de este Capítulo, la habilidad de *R. solanacearum* de causar enfermedad está muy vinculada a los productos de una gran cantidad de genes que contribuyen en forma colectiva en el proceso de invasión, colonización y finalmente muerte del hospedero. Son pocos los factores descritos cuya ausencia presenta un fenotipo claro de pérdida de la virulencia de la bacteria. La mayoría de los factores que se citaron para *R. solanacearum* son de carácter cuantitativo y es la acción conjunta de todos ellos lo que define el éxito del patógeno.

Esta situación, que se presenta en la mayoría de los patógenos tanto de animales como de vegetales, ha llevado a los patólogos a repensar el concepto de factores de patogenicidad, ya que el límite entre estos y los genes *housekeeping* se vuelve cada vez más borroso, en tanto más aprendemos sobre los procesos de enfermedad (Brown, 2005).

Según Wassenaar y Gaastra (2001), los genes de patogenicidad se podrían agrupar en 3 categorías: (1) genes de virulencia verdaderos, que no están presentes en los no patógenos;

(2) genes asociados a la virulencia, que están involucrados en el procesamiento, regulación y apoyo de los genes de la categoría 1 y (3) genes relacionados al estilo de vida del patógeno, que mejoran su competencia dentro del hospedero.

Es, en última instancia, el interés en aprender más sobre los genes de las categorías 2 y 3 lo que motiva abordajes experimentales más complejos, pero que buscan describir el comportamiento del patógeno *in vivo*. A continuación se describirán dos de estas técnicas: IVET y RIVET.

1.4.1. IVET y RIVET: construyendo trampas de promotores.

IVET es una estrategia desarrollada hace casi 30 años atrás por Osbourn *et al.* (1987). Su aplicación se ha vuelto popular en la última década y ha sido muy útil para identificar genes involucrados en el crecimiento o virulencia de bacterias y hongos asociados a sus hospederos (ya sea en forma parásita, mutualista o simbiote). Existen variantes de IVET: en una de ellas, el hospedero es usado para seleccionar genes del microorganismo de interés, cuya expresión se induce específicamente en el ambiente en estudio. Requiere la construcción de una biblioteca genómica, con fragmentos del cromosoma del microorganismo, fusionados a un gen sin promotor que es vital para la supervivencia en el hospedero. Este gen vital, además, está unido a un gen marcador (*uidA*, *gfp*, *lacZ*), también sin promotor. Esta biblioteca se introduce en una cepa que carece del gen vital o que es auxotrófa para ese gen. Las cepas resultantes se agrupan y se analizan en el hospedero, seleccionando mediante el gen marcador a aquellas que restauraron la función vital y pudieron sobrevivir en el hospedero (Figura 1.7). Luego, se analizan los clones seleccionados en la planta en condiciones de laboratorio para eliminar los promotores constitutivos y

generar una colección de aislamientos que se expresan solo por señales específicas de la planta. Una vez que se identifican esas cepas, se analiza el fragmento que tiene el promotor para determinar su identidad y predecir la función del gen (Brown, 2005).

IVET se ha aplicado con éxito en el estudio de la interacción microorganismos – plantas (Brown y Allen, 2004; Yang *et al.*, 2004; Barr *et al.*, 2008; Silby *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2013, entre otros).

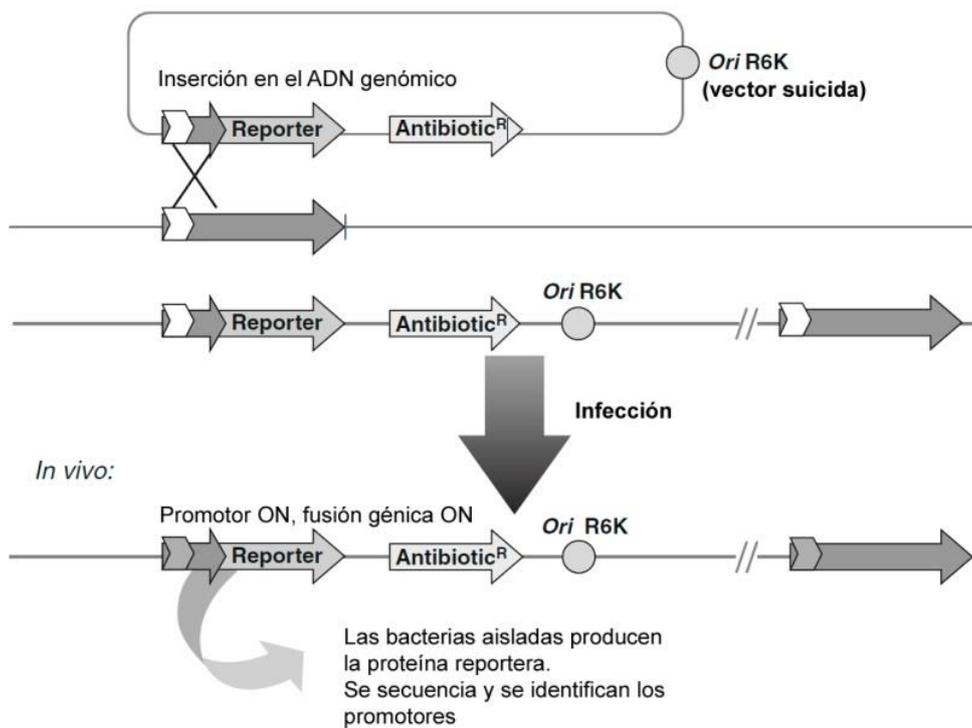


Figura 1.7. Esquema del enfoque IVET: Una biblioteca de promotores fusionados a un gen reportero se genera por medio de una recombinación sitio específica en el ADN genómico de la cepa en estudio. El gen original es mantenido y una única copia de la fusión con el reportero se introduce en el microorganismo. Bajo condiciones ambientales variables, se puede medir la activación del promotor, midiendo la actividad de la proteína reportera. Modificado de Hsiao y Zhu (2009).

IVET suele basarse en auxotrofías, tal como se ha descrito o en genes de resistencia a antibióticos sin promotor. Sin embargo, pronto se vió la necesidad de generar un sistema que fuera generalizable a todas las bacterias y que pudiera ser fácilmente seleccionable fuera del hospedero. Camilli y *et al.* (1994) desarrollaron una técnica modificada de IVET,

Recombinase-based In Vivo Expression Technology o RIVET. En la estrategia RIVET, la auxotrofia es sustituida por una recombinasa sitio específica (resolvasa) sin promotor, que escinde un *cassette* que está inserto en el genoma de la bacteria en estudio cuando existe un fragmento inducible *upstream* a la resolvasa. La activación genera un cambio irreversible que se puede seguir con genes marcadores adicionales. La resolvasa usada por Camilli y su grupo fue *tnpR*, del elemento transposable $\gamma\delta$, que reconoce dos sitios repetidos en el elemento $\gamma\delta$ (sitios *res*) y los corta para resolver la co integración (Hsiao y Zhu, 2009).

Entre las ventajas que presenta RIVET frente a IVET, la primera permite descartar los promotores constitutivos previo al tratamiento *in vivo*, lo que simplifica el proceso post inoculación. También es posible emplearlo para analizar patrones temporales y espaciales de inducción de genes de virulencia durante la infección (Slauch y Camilli, 2000). Debido a que la activación de promotores en RIVET genera un cambio irreversible en la bacteria en estudio (la pérdida de un *cassette* marcador flanqueado por sitios *res*), RIVET es mucho más sensible que IVET y permite seleccionar promotores que se expresan en forma transitoria o muy débilmente. Esta última ventaja es, contradictoriamente, su principal ventaja y su principal desventaja, ya que el *cassette* puede ser escindido por acción de genes constitutivos durante la introducción de la biblioteca genómica a la cepa reportera y consecuentemente, la bacteria puede perderse en el proceso de desarrollo de la estrategia. Para subsanar esto, el grupo de Camilli desarrolló un RIVET de segunda generación (Osorio *et al.*, 2005) en la cual se generaron alelos de *tnpR* que varían en su eficiencia traduccional y permiten modular la sensibilidad del sistema.

Al igual que IVET, RIVET se ha aplicado profusamente al estudio de interacciones planta microorganismo (Gao y Teplitski, 2008; Noel *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2013; Marvasi *et al.*, 2013; Kroupitski *et al.*, 2013, entre otros). Un ejemplo de RIVET aplicado al estudio de

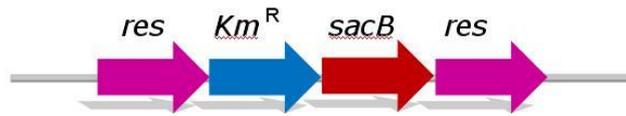
fitopatógenos-plantas es el desarrollado por Tamir-Ariel *et al.* (2007) para identificar los promotores que son inducidos en *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Xcv) cuando interactúa con tomate. Para lograr este objetivo los autores generaron, en primer lugar, una cepa reportera o cepa *res*, integrando un *cassette res* (*res-Kmr-sacB-res*) en el genoma de la cepa de Xcv. Los sitios *res* se encuentran flanqueando un gen de resistencia a la kanamicina (Km) y un segundo gen reportero, *sacB*, que impide el crecimiento de la cepa a altas concentraciones de sacarosa.

Por otro lado, se construyó una genoteca de Xcv en un plásmido pRIV, que tiene una fusión transcripcional sin promotor de los genes de la resolvasa (*tnpR*) y de la β - glucuronidasa (*uidA*). TnpR es capaz de reconocer y digerir los sitios específicos (*res*) insertados previamente en la cepa reportera.

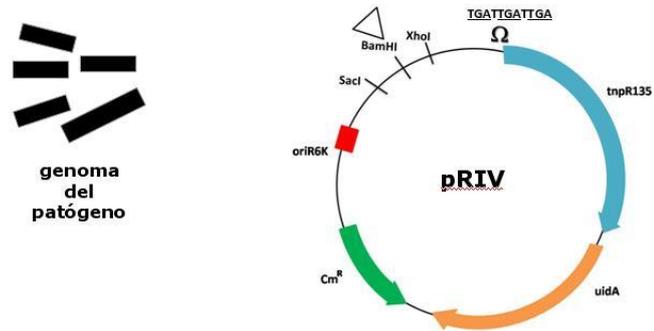
A continuación se conjugó la genoteca en la cepa reportera. Si en la genoteca se introdujo un promotor en la zona *upstream* a la fusión transcripcional *tnpR-uidA*, va a ocurrir que se va a expresar la resolvasa. La resolvasa va a actuar sobre los sitios *res*, escindiendo el *cassette*, en un proceso llamado resolución. Las células que eliminan el *cassette res* pierden su habilidad para crecer en presencia del antibiótico pero son capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de sacarosa.

Luego se eliminaron todas las cepas inducidas *in vitro* (cepas que se resolvieron en un medio de cultivo nutritivo debido a que poseen un promotor constitutivo) lavándolas tres veces con medio rico suplementado con kanamicina. Las cepas no resueltas se usaron para inocular plantas de tomate. Luego se recuperaron de las hojas de tomate las cepas que se resolvieron *in vivo* y se caracterizaron los genes de interés. Los pasos se ilustran en la Figura 1.8.

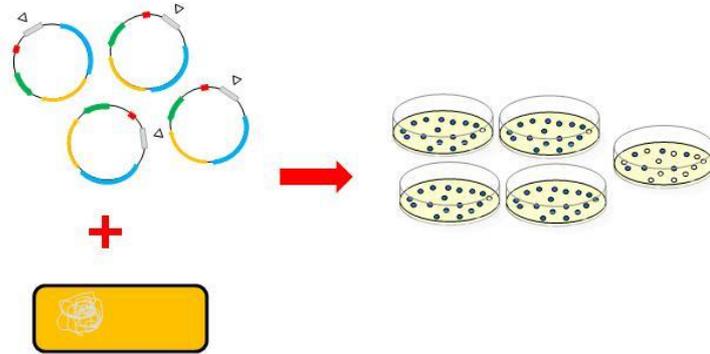
Generación de la cepa reportera



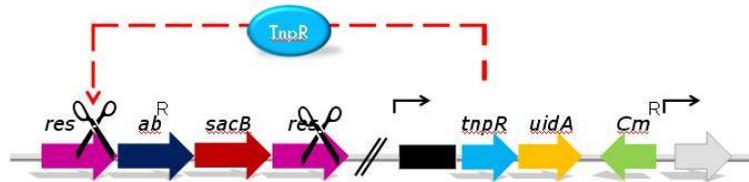
Clonación del genoma de Xcv en pRIV



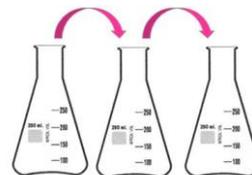
Se transforma la mezcla de ligación *E. coli*



Se conjuga la genoteca en la cepa reportera



Eliminación de cepas con promotor de actuación constitutiva.



Se inoculan plantas de tomate con las cepas no resueltas



Se extraen las bacterias de la planta infectada y se selecciona por habilidad de crecer en 10% de sacarosa. Se verifica sensibilidad a Km.

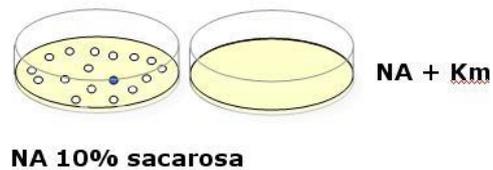


Figura 1.8. Esquema general de la estrategia RIVET. Modificado de Tamir-Ariel *et al.* (2007)

1.4.2. Antecedentes de estudios *in vivo* en *R. solanacearum*.

En el año 2004, Brown y Allen aplicaron IVET a la cepa K60 de *R. solanacearum* (raza 1), en su interacción con tomate. Identificaron 153 genes de la bacteria que se expresan únicamente bajo condiciones en planta, dentro de los que se incluyen siete genes de virulencia previamente identificados (*pehR*, *vsrB*, *vsrD*, *rpoS*, *hrcC*, *pme* y *gspK*) y siete genes adicionales que podrían codificar para factores de virulencia. Otros genes identificados estarían involucrados en la adaptación del patógeno al xilema del hospedero: codificarían para proteínas con funciones metabólicas relacionadas con el transporte y con la respuesta a estrés. También hallaron genes que codifican para posibles proteínas transmembrana. Un número significativo de los genes encontrados codifican para proteínas de función desconocida, varios de los cuales parecerían ser exclusivos de *R. solanacearum*. Un pequeño porcentaje de los genes estudiados parecerían ser específicos de K60 ya que sus secuencias no están presentes en el genoma de la cepa GMI1000 (cepa que también es de raza 1).

Quizás el resultado más impactante de este estudio sea que la mayoría de los genes hallados se encuentran en el cromosoma de la bacteria, lo cual va contra la hipótesis planteada por Salanoubat *et al.* (2002) que predecía que la mayoría de los genes necesarios para cumplir las funciones in planta se localizaban en el megaplásmido.

Recientemente se han publicado estudios de *microarrays* de expresión y transcriptómica que también apuntan al estudio de la interacción de *R. solanacearum* con planta de tomate (Jacobs *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2012 A). De estos trabajos se desprende que la bacteria podría reconfigurar el metabolismo del hospedero para su propio beneficio y los resultados de estos estudios ponen en tela de juicio algunos paradigmas que han imperado en

fitopatología durante los últimos 30 años: que TTSS no se expresa en etapas tardías de la infección y que el xilema es un ámbito nutricionalmente pobre para la bacteria.

La mayoría de estos estudios orientados a describir la interacción planta-hospedero han apuntado al sistema tomate-*R. solanacearum* y muchos de ellos emplean cepas del filotipo I /raza 1. Tal como establecimos previamente, las cepas de *R. solanacearum* son muy heterogéneas. Conjugando esto a las características propias de cada hospedero, los hallazgos previos no son fácilmente trasladables al patosistema papa-*R. solanacearum* filotipo II/ raza 3, que es el de mayor interés para la producción nacional.

Además, ninguna de las técnicas empleadas en los estudios citados (IVET, *microarrays* de expresión, transcriptómica) permite estudiar los genes de la bacteria que se inducen sutilmente o transitoriamente. En este contexto, y con el objetivo de contribuir a la comprensión de la interacción *R. solanacearum* r3bv2-*S. tuberosum*, surge esta tesis.

1.5. Objetivos.

Esta tesis buscó aplicar la estrategia RIVET para identificar genes de *R. solanacearum* r3bv2 que se expresan durante la infección en papa. La aplicación previa de IVET por Brown y Allen (2004) en el estudio de una cepa de *R. solanacearum* raza 1 en tomate brindó una sólida base para la ejecución de esta propuesta. Como ya ha sido establecido, los genomas de estas razas presentan una gran variabilidad entre sí, por lo que aplicar RIVET a *R. solanacearum* r3bv2 durante su interacción con papa aporta al conocimiento de los factores de patogenicidad. Debido a que Saúl Burdman, co tutor de esta tesis, dirigió el trabajo de Tamir-Ariel *et al.* (2007), se propuso llevar a cabo RIVET siguiendo los mismos pasos establecidos en la Figura 1.8.

Objetivo general:

Identificar genes de *R. solanacearum* raza 3, biovar 2 (cepa UY031) que se expresan durante la infección con *Solanum tuberosum*, utilizando la técnica de RIVET.

Objetivos específicos:

- Construir una cepa reportera de *R. solanacearum* r3bv2 por inserción del *cassette res* para establecer la estrategia RIVET para *R. solanacearum* – papa.
- Construir controles con promotores de comportamiento conocido fusionados a *tnpR-uidA* para verificar la funcionalidad del sistema *in vitro* y en la planta.
- Generar una biblioteca de fragmentos genómicos de la bacteria fusionados a *tnpR-uidA* sin promotor y realizar experimentos RIVET a gran escala para aislar cepas que expresen TnpR y β -glucuronidasa frente a señales específicas de la planta.
- Identificar los genes bacterianos inducidos en la planta en base a las cepas aisladas.

Desarrollo de la cepa reportera de *Ralstonia solanacearum* UY031.

Resumen

El primer paso de la estrategia RIVET implica construir una cepa reportera para estudiar la interacción *Ralstonia solanacearum* r3bv2 (Filotipo IIB) – *Solanum tuberosum*. La cepa de partida elegida es UY031, aislada en un campo papero de Uruguay. En este capítulo se presenta la construcción y verificación de la cepa reportera UY031_res. El clon caracterizado (UY031_res9) presentó una única inserción del *cassette res* en la región elegida como blanco para la doble recombinación. En los experimentos realizados no se observaron restos del vector que indiquen una cointegración. El aspecto de las colonias de UY031_res9 en medio sólido fue típico de *R. solanacearum*. Este clon creció a una velocidad similar a la cepa *wild type* y su agresividad en planta no presentó diferencias estadísticamente significativas con la cepa UY031. El *cassette* fue estable en los ensayos realizados aunque el gen *sacB* no se comportó de acuerdo a lo esperado.

2.1. Introducción.

A la hora de delinear la estrategia RIVET para *Ralstonia solanacearum* r3b2 (Filotipo IIB) se decidió trabajar con la cepa UY031. Esta cepa fue aislada en el año 2003 en la Cátedra de Microbiología de Facultad de Química (UdelaR) a partir de un tubérculo de papa. La muestra de papa, proveniente de una chacra papera del Departamento de San José (Uruguay), exhibió síntomas de la enfermedad. En ensayos de agresividad en papa (*S. tuberosum* cv.

Chieftain), la cepa UY031 exhibió una alta agresividad, similar a la de la cepa de referencia UW551 (Siri *et al.*, 2011).

Brevemente, para llevar a cabo la estrategia RIVET se construye una genoteca del patógeno empleando un vector que posee una fusión transcripcional sin promotor. Esta biblioteca se introduce en una cepa reportera de *R. solanacearum*, mutada por inserción de un *cassette* reportero. El *pool* de microorganismos resultante se emplea para infectar a la papa. Si un promotor clonado *upstream* a la fusión transcripcional es activado, dirigirá la expresión de los genes fusionados. Esta expresión puede ser monitoreada mediante el *cassette* reportero (Figura 1.8).

El primer paso de la estrategia implica desarrollar una cepa reportera a partir de la cepa UY031. Para ello debemos introducir un *cassette* reportero de la expresión génica en una región del genoma de la bacteria que sea neutra para la virulencia, de forma tal que la introducción del *cassette* no afecte su capacidad de enfermar a la planta.

El *cassette* reportero empleado fue desarrollado por Camilli y col. en 1994. El sistema de detección se basa en el uso del gen de la resolvasa (*tnpR*) del elemento de inserción $\gamma\delta$ como parte de la fusión transcripcional. La resolvasa reconoce una secuencia particular de ADN llamada *res* y la corta, provocando un cambio irreversible en el ADN (Reed y Grindley, 1981).

El *cassette* reportero consiste en un gen de resistencia a la kanamicina (Km^R) y un gen de sensibilidad a altas concentraciones de sacarosa (*sacB*), flanqueados por secuencias *res*. Nuestro sistema emplea así una escisión mediada por la resolvasa para generar una cepa sensible a la kanamicina y resistente a altas concentraciones de sacarosa (mayores al 10% p/v).

En este capítulo se presenta la construcción y verificación de la cepa reportera.

2.2. Materiales y métodos.

2.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios.

Las cepas bacterianas y los plásmidos usados se enumeran en la Tabla 2.1 y 2.3. Las cepas de *Ralstonia solanacearum* se cultivaron en medio BG completo suplementado con Cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (TZC) 0,05% y 1,8% de agar (Boucher *et al.*, 1985). Se incubaron a 28°C por 48 h. Para la extracción de ADN genómico, las cepas se inocularon en caldo BG sin glucosa (BG base) y se incubaron ON a 28°C con agitación (150 rpm). Para la transformación natural se incubó a *R. solanacearum* por 48 – 72 h. en caldo Mínimo MP suplementado con glicerol al 2% y caldo BG base. Las cepas de *Escherichia coli* empleadas se incubaron en medio Luria-Bertani (LB, Sambrook y Rusell, 2001) a 37°C. Se agregaron antibióticos cuando fue necesario, en las siguientes concentraciones: Ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Kanamicina (Km) 50 µg/mL, Cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL y Espectomicina (Sp) 100 µg/mL. La composición de los medios se describe en el Anexo II.

2.2.2. Manipulación del ADN.

La extracción de ADN genómico, la clonación, la amplificación de ADN y las minipreparaciones de plásmidos se realizaron siguiendo los procedimientos estándares descritos en Sambrook y Rusell (2001). La purificación de fragmentos de ADN generados por amplificación o digestión se realizó mediante los kits de Real Biotec Corporation (Taiwan) y QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen (Alemania). Las enzimas de restricción fueron adquiridas en Fermentas (Canadá) y en New England Biolabs (EEUU). En las amplificaciones de rutina se usó *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, EEUU). Las amplificaciones del *cassette res-sacB-Km^R-res* y de productos de tamaño ≥ 3 kb se realizaron

con la enzima de alta fidelidad Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Kapa Biosystems, USA). Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TBE 0,5x excepto cuando se especifique otra condición. Se empleó un volumen conocido de marcador de ADN de peso molecular 1 kb SmartLadder (Eurogentec, EEUU) en las electroforesis para estimar el tamaño y la concentración del ADN en estudio.

Tabla 2.1: Resumen de cepas empleadas.

Cepa/Plásmido		
Nombre	Características	referencias
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
UY031	<i>wild type</i> raza3 biovar 2 Amp ^R	Siri <i>et al.</i> , 2011
UY031_res9	UY031 <i>res cassette</i> Km ^R Suc ^S	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
TopTen	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

2.2.3. Diseño de *primers* y optimización de las reacciones de amplificación.

Todos los *primers* usados para llevar a cabo las construcciones génicas y las verificaciones de los clones transformantes fueron diseñados mediante el *software* libre Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000; Tabla 2. 2). Se verificó la ausencia de horquillas y de estructuras secundarias con el *software* comercial Vector NTI11 (Life Technologies). También se constató que los pares no formarían homodímeros ni heterodímeros *in silico* a la temperatura de *annealing* de trabajo.

Tabla 2.2: *Primers* usados en este Capítulo: se subrayan los sitios de restricción agregados

Primers		
Nombre	Secuencia	Referencia
resFEco81I	TTGC <u>cctgagg</u> ACTACTTAGGGCGAATTGG	Este estudio
resREco81I	TTGC <u>cctgagg</u> CACTAAAGGGAACAAAAGCTGG	Este estudio
secresF2	GGTTGCATTTCGATTCTGTT	Este estudio
secresR2	ACAGGTACCATTGCGGTTTC	Este estudio
secresF3	TGGAAGAAGCAGACCGCTAA	Este estudio
secresR3	TGCAAAGACGATGTGGTAGC	Este estudio
secresF4	GCACATCATTCTTCCGTC	Este estudio
secresR4	ATGGCAAGATCCTGGTATCG	Este estudio
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Primer universal
T7	AATACGACTCACTATAG	Primer universal
2UFXbal	ctag <u>tctaga</u> TGGCTCTGACTGACGATGAC	Este estudio
2UREco81I	TTGC <u>cctgagg</u> CCACATCAGCTTTGACATGC	Este estudio
2DFEco81I	TTGC <u>cctgagg</u> ACGTTTCGAGCGATACTTCGT	Este estudio
2DRSacl	CTGC <u>gagctc</u> GTTTAAGGCGGACAACAAGC	Este estudio
F1resF	CGCTCAAGCTCAAGGAAATC	Este estudio
F1resR	CAAGACGTTTCCCGTTGAAT	Este estudio
resF2F	GCTGTACCTCAAGCGAAAGG	Este estudio
resF2R	CGATTCGTGGATGACTTGTG	Este estudio
F1IR	CACGCTTCACATCGTCGTAG	Este estudio
IF2F	GCGTGAAAGTGAGCGTATTG	Este estudio
IF2R	CGATTCGTGGATGACTTGTG	Este estudio
UDF	CTACAACGAGTGGCTGAAGG	Este estudio
UDR	TCGAGCAAGACGAAGTATCG	Este estudio
Ftnp	GTGCTGCAAGGCGATTAAGT	Este estudio
RtnpRIVET	CTTTCCGATCGCATGAACTG	Tamir – Ariel <i>et al.</i> , 2007

Algunos pares de *primers* incluyeron los sitios de restricción que se indican con color. La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en Macrogen (Corea). Las reacciones de amplificación fueron optimizadas mediante PCR con gradiente en el termociclador Gradient Palm-Cycler (Corbett). Las amplificaciones de rutina se realizaron en este termociclador y en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EEUU).

2.2.4. Análisis de secuencias.

El estudio de los sitios de restricción y el análisis de los plásmidos secuenciados implicó el uso de los siguientes programas: Webcutter 2.0.

(<http://users.unimi.it/~camelot/tools/cut2.html>), Vector NTI (Life Technologies), MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2007), NCBI BLAST Database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.5. Construcción para obtener la cepa reportera de *R. solanacearum* UY031 por introducción del *cassette res*.

Se seleccionó una zona neutra del genoma de la cepa UY031 de 2,8 kb, de acuerdo a los criterios desarrollados en el inciso 2.3.1 de este capítulo. Se dividió en dos regiones a las que se les llamó región U (*upstream*) y región D (*downstream*). Se amplificaron U y D con los pares de *primers* 2UF_XbaI, 2UR_Eco81I y 2DF_Eco81I, 2DR_SacI respectivamente. Se incluyeron sitios de restricción específicos, necesarios para los subsecuentes pasos de clonación. Cada amplicón de 1 kb se clonó en el vector pGem T-Easy (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) para obtener los plásmidos pU y pD. De igual manera, se amplificó el *cassette res* a partir de pRes con el par de *primers* FresEco81I y RresEco81I. Este amplicón de 3,3 kb también se clonó en pGem T-Easy. Los distintos plásmidos resultantes (pU19, pD02 y

pRes9; Tabla 2.3) se verificaron por restricción y secuenciación. Los plásmidos pU19 y pD02 se digirieron con *Eco81I* y *SacI*. El resultado de esta digestión es la linearización de pU19 y la escisión del inserto D en pD02. Se ligó el fragmento D en el plásmido pU02. El plásmido obtenido pDU43 se verificó por restricción y secuenciación parcial. Por último, pDU43 y pRes se digirieron con *Eco81I*. En el caso de pRes, se liberó el *cassette res* en tanto pDU43 quedó lineal. Finalmente, se ligó el *cassette res* en pDU43 para obtener pDUres20, que es la construcción deseada. Este plásmido se introdujo en las cepa UY031 de *R. solanacearum* mediante transformación natural. Los clones obtenidos se nombraron como UY031_res y números consecutivos (Figura 2.2).

En todos los casos, luego de la ligación se precipitó el ADN con ARNt de levadura (Invitrogen, EEUU), de acuerdo al protocolo de Zhu y Dean (1999) y se transformó *E. coli* TopTen por electroporación.

Tabla 2.3: Resumen de plásmidos empleados en la generación de la cepa reportera.

Plásmidos		
Nombre	Características	Referencia
pGEM T – Easy	Ap ^R , Vector de clonado TA	Promega
pRES	Ap ^R Km ^R , vector conteniendo <i>res -Km^R- sacB-res</i>	A. Camilli
pU19	Ap ^R , región downstream a los genes <i>glmU glmS</i> comprendida entre 266234 -267243 pb, anotación cepa IPO1609 (región U) en el vector pGEM T-Easy	Este estudio
pD02	Ap ^R , región downstream a los genes <i>glmU glmS</i> comprendida entre 267925 - 268936 pb, anotación cepa IPO1609 (región D) en el vector pGEM T-Easy	Este estudio
pDU43	Ap ^R , regiones U y D en pGEM T- Easy	Este estudio
pRes9	Ap ^R , Km ^R , pGEM T- Easy conteniendo <i>res – Km^R - sacB - res</i>	Este estudio
pDUres20	Ap ^R , Km ^R , pGEM T- Easy conteniendo región U - <i>res – Km^R - sacB – res</i> -región D	Este estudio

2.2.6. Transformación natural.

La transformación natural se llevó a cabo tal como lo describe Bertolla *et al.*, 1997 (Figura 2.1). Se partió de un cultivo fresco de la bacteria, de $DO_{600} = 0,5 - 1$ en caldo mínimo MP o caldo BG base. Posteriormente se depositó una membrana de nitrocelulosa con poro de $0,45 \mu\text{m}$ sobre una placa de medio BG base. En la superficie del filtro se mezclaron $20 \mu\text{L}$ del cultivo con $0,5 \mu\text{g}$ de ADN lineal o circular. La placa se incubó a 28°C hasta que se observó crecimiento sobre el filtro (habitualmente en 2 días). El filtro se lavó con 1 mL de medio BG base. La suspensión se colectó con un tip, se fraccionó en $100 \mu\text{L}$ y el resto, se sembraron con rastrillo sobre placas de medio BG completo suplementado con TZC y el antibiótico de selección. Las placas se incubaron hasta 7 días y se inspeccionaron visualmente hasta la aparición de transformantes. Se incluyó un control negativo que consiste en la mezcla sobre filtro de los $20 \mu\text{L}$ del cultivo, con agua.

2.2.7. Southern Blot: Se siguió la técnica descrita por Southern (1975). Se digirió aproximadamente $1 \mu\text{g}$ de ADN genómico de los clones transformantes UY031_res 1-4 y 6-10, UY031 y UW551 con la enzima de restricción *AgeI*. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x con SYBR safe. El ADN se transfirió desde el gel a una membrana de secuenciación (Millipore) aplicando presión con una bomba de vacío con manómetro.

Para la transferencia se colocó el gel sobre la membrana y se trató con una solución depurinizante ($\text{HCl } 0,25 \text{ M}$) por 3 minutos a 30 mbar. Luego se cubrió el gel con una solución desnaturalizante ($0,5 \text{ N NaOH}$, $1,5 \text{ M NaCl}$) por 7 minutos a 30 mbar. Se neutraliza con una solución neutralizante (1 M Tris-HCl , $1,5 \text{ M NaCl}$, $\text{pH } 7,5$) por 7 minutos a 30 mbar. Finalmente se transfirió el ADN por una hora a 50 mbar con la solución de transferencia SSC

10X (1,5 M NaCl, 0,15 M Na citrato, pH 7). La membrana se secó a 68 °C por 20 minutos y se expuso al UV por 2 minutos, para entrecruzar el ADN.

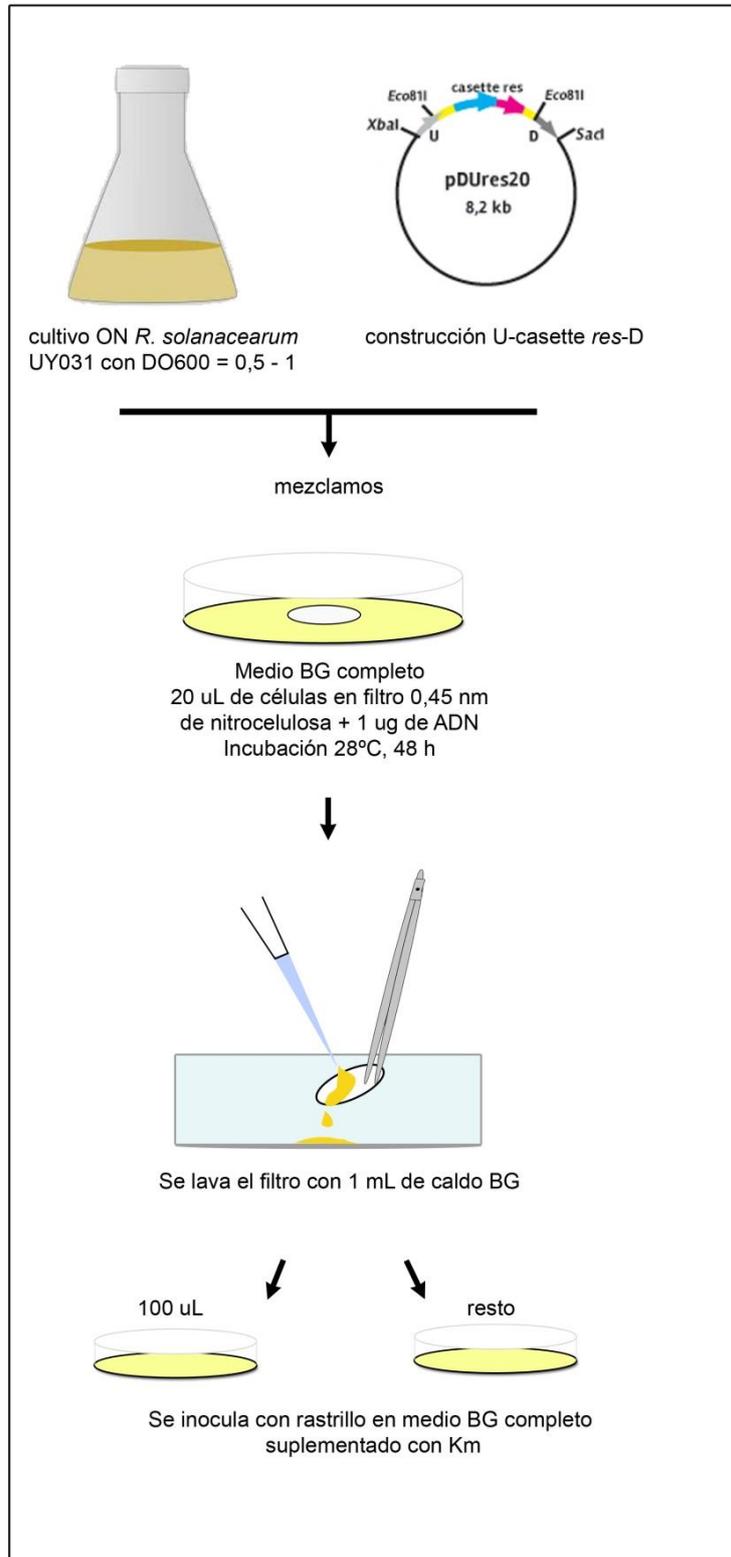


Figura 2.1. Esquema del proceso de transformación natural para obtener mutantes en *R. solanacearum*.

La membrana se hibridó por una hora a 68°C con la solución de prehibridación. La sonda marcada y desnaturalizada se agregó a la solución de prehibridación. Se incubó toda la noche a 68°C. La membrana se lavó 2 veces con 20 mL de SSC 2X SDS 0,1% a temperatura ambiente, por 5 minutos. A continuación se hizo un lavado con 20 mL de SSC 0,1X SDS 0,1% por 15 minutos a 68°C.

Para la detección se empleó el kit Phototope – Star Detection (New England Biolabs, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente la membrana se expuso a una placa de rayos X por dos horas y media.

La sonda consistió en el *cassette res*, que se obtuvo de digerir pDures20 con *Eco81I*. El fragmento correspondiente al tamaño esperado se purificó a partir del gel y se marcó con el kit NE Blot Phototope Kit (New England Biolabs, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.8. Ensayo en plantas.

Se realizó un estudio de la agresividad del clon transformante 9 UY031_res en planta de papa. Se obtuvieron plantines de *S. tuberosum* cv. Chieftain por micropropagación *in vitro* a partir de un entrenudo de la planta madre en medio Murashige y Skoog agar (Murashige y Skoog, 1962; Anexo II) suplementado con sacarosa 30 g/L. Los plantines se mantuvieron tres semanas a 22°C con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Luego se transfirieron a germinadoras con pocillos de 17 cm³ conteniendo suelo comercial (Tref, Moerdijk, The Netherlands) y se aclimataron en invernadero a 22-25°C bajo luz natural previo a la inoculación. El ensayo de inoculación se realizó en tierra con herida de raíz (producida con un tip). Se definió como unidad experimental a 10 plantines. Se realizaron 3 réplicas de la unidad experimental por cepa (en total, 30 plantines inoculados por cepa). Se empleó el clon

transformante 9 de UY031_res y se incluyeron dos controles: un blanco de agua y UY031 (cepa WT). Se inoculó cada plantín con 1 mL de una suspensión 10^8 ufc/mL de la cepa correspondiente o con 1 mL de agua. Las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28°C con un fotoperíodo de 12 horas. La evaluación de los síntomas se realizó cada día, utilizando una escala ordinal: 0 (sin síntomas), 1 (de 0 a 24% de la planta con síntomas), 2 (de 25 a 49% de la planta con síntomas), 3 (de 50 a 74% de la planta con síntomas) y 4 (de 75 a 100% de planta con síntomas).

2.2.9. Curva de crecimiento de los clones transformantes de UY031_res (screening).

Se inocularon tubos estériles con 5 mL de medio BG sin glucosa, suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de Kanamicina cuando fue necesario, de modo de que tuvieran una DO_{600} inicial = 0,020. Se incubaron a 28°C con agitación (150 rpm). Se hicieron recuentos del inóculo inicial. El crecimiento bacteriano se monitoreó espectrofotométricamente a 600 nm.

2.2.10. Ensayo de estabilidad del *cassette res* en la cepa reportera.

Para verificar que el *cassette* es estable en la cepa reportera y que ésta no se resuelve espontáneamente, se la cultivó en medio BG base y medio MP sin antibiótico y hasta saturación tres veces consecutivas. A partir del último cultivo, se plaquearon diluciones en Agar Nutriente y se transfirieron unas 20 colonias a nuevas placas con Agar Nutriente suplementado con Km y sin Km. Se determinó el número de colonias que crecían en Agar Nutriente con y sin Km y se comparó al número de colonias que mantenían la resistencia a Kanamicina luego de eliminar la presión selectiva durante tres repiques consecutivos.

2.2.11. Crecimiento de UY031_res9 en medio rico suplementado con $\geq 10\%$ p/v de sacarosa.

La presencia del gen *sacB* (marcador positivo) impide a la cepa crecer en altas concentraciones de sacarosa (mayor igual 10%). En el proceso de resolución de la cepa, el *cassette* se pierde, y con este, el gen *sacB*. La ausencia de este gen permite a la cepa crecer a altas concentraciones de sacarosa. Se verificó el crecimiento de UY031_res9 en agar BG completo y Agar Nutriente suplementado con 10% p/v y 15% p/v de sacarosa. La cepa UY031 se empleó como control.

2.3. Resultados.

2.3.1. Construcción de la cepa reportera: inserción del *cassette res* en una zona neutra del genoma de *R. solanacearum* UY031.

Para construir un mutante de *R. solanacearum* que actúe como cepa reportera del sistema RIVET, se debe insertar el *cassette res* en una región neutra del genoma de la bacteria, es decir, una zona que pueda ser interrumpida sin afectar la capacidad infectiva de la cepa. Es conveniente que esta región posea un tamaño 2,5 kb o mayor, para facilitar la inserción del *cassette res*. Durante la búsqueda de una zona con estas características, se tuvo en cuenta además que se tratara de una porción de ADN de función desconocida, que no tuviera homología con ningún gen ya descrito y que no estuviera presente en otras razas de *R. solanacearum* ni en otros microorganismos. Se analizó manualmente el 50% del genoma de la cepa de *R. solanacearum* IPO1609 (raza 3, biovar 2), que ha sido secuenciada y anotada (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>).

Siguiendo estos criterios sugeridos por el Dr. Marc Valls (Departamento de Genética, Universidad de Barcelona, comunicación personal) se seleccionaron varias regiones potencialmente neutras (Tabla 2.4). Se verificó la presencia de esas regiones en el genoma de *R. solanacearum* UW551, que es otra cepa raza 3, biovar 2 secuenciada, aunque su anotación se encuentra en etapa borrador.

Finalmente se escogió la región 2 dado que, durante el transcurso de esta tesis se demostró que se pueden realizar inserciones en esa zona del genoma sin afectar el fenotipo *wild type* de la cepa (Monteiro *et al.*, 2012 B).

Tabla 2.4: Regiones potencialmente neutras.

#	Región del genoma	ORF abarcados	Blast con GeneBank (*)
1	Región de 2, 82 kb comprendida entre 57782-60597 pb	RslPO 00042 (57782 - 57991), RslPO 00043 (57998 – 58636), RslPO 00044 (58890 – 59731), RslPO 00045 (59728 – 60597)	57% identidad de secuencia con <i>Burkholderia cenocepacia</i> MCO-3
2	Región de 2,81 kb comprendida entre 266156 – 268969 pb	Región intergénica (266156-266287), RslPO 04967 (266287-266517), RslPO 04966 (266964 – 268055), RslPO 00233 (268061 – 268969)	No hay similitud de secuencia con otros microorganismos.
3	región de 3,54 kb comprendida entre 938845 – 942379 pb	RslPO 00878 (938845 – 939783), RslPO 04972 (939780 - 940673), RslPO 04973 (940802 - 9412118), RslPO 00879 (941274 -942116), RslPO 0880 (942203 - 94279)	No hay similitud de secuencia con otros microorganismos.
4	Región de 6,87 kb comprendida entre 1228072 – 1234942 pb	RslPO 01137 (1228072 - 1232229), RslPO 04395 (1232678 - 1230820), RslPO 04897 (1233659- 1234042), RslPO 04896 (1234295 - 1234942)	No hay similitud de secuencia con otros microorganismos.
5	Región 1,99 kb comprendida entre 1371531 - 1373515 pb	RslPO 04998 (1371531 - 137206), RslPO 04999 (1372069 - 1372761), RslPO 01259 (1372805 – 1373515)	No hay similitud de secuencia con otros microorganismos.
6	Región de 3,35 kb comprendida entre 2289515 -2292865 pb	RslPO 04533 (2289515), RslPO (04934), RslPO 04935 (2292865)	No hay similitud de secuencia con otros microorganismos.
7	Región de 2,13 kb comprendida entre 2357620 - 2359751	RslPO 02154 (2357620 - 2357919), RslPO 05008 (258130 - 2358588), RslPO 02155 (2358592 - 259047), RslPO 02156 (2359050 - 2359751)	No hay similitud de secuencia con otros microorganismos.

Se indican las zonas de acuerdo a la anotación del genoma de la cepa IPO1609.

(*) Todas as regiones presentan 100 % identidad de secuencia con *R. solanacearum* IPO1609

2.3.2. Obtención del mutante *res* (cepa reportera) de *R. solanacearum* UY031 mediante un evento de doble recombinación homóloga.

Para generar la cepa reportera se introdujo el *cassette res* por doble recombinación homóloga en la región 2. El esquema de trabajo se ilustra en la Figura 2.2.

Inicialmente se diseñaron *primers* y se amplificaron los fragmentos de aproximadamente 1 kb comprendidos entre las regiones 266234 - 267244 pb y 267925 - 268936 del genoma IPO16096, respectivamente, usando como molde el ADN de UY031. A la primera porción de la región 2 se le llamó U (*upstream*) y a la segunda porción se le llamó D (*downstream*). Entre U y D existe una porción génica de unos 680 pb que será eliminada durante el evento de doble recombinación homóloga. A esa región, ubicada entre U y D, se le llama intergénica, se la anota como I y corresponde a la porción comprendida entre 266964 – 268055 pb de IPO_04966 (según la anotación de la cepa IPO1609, Figura 2.5)

Las amplificaciones se optimizaron realizando una PCR de gradiente, variando la temperatura de *annealing* entre 60 – 72°C. Se obtuvo el producto de amplificación deseado bajo todas las condiciones ensayadas.

Los amplicones U y D se clonaron en el vector pGem T-Easy para obtener pU19 y pD02. Las construcciones fueron verificadas por digestión con las enzimas de restricción *Eco81I* y *SacI*, por PCR con *primers* SP6/T7 y por análisis de secuencia del producto de amplificación.

De la misma forma se optimizó la amplificación del *cassette res* a partir del plásmido pRes con los *primers* FresEco81I y RresEco81I mediante una PCR en gradiente y se clonó en pGem T-Easy. La construcción fue verificada por digestión con la enzima de restricción *Eco81I* y por análisis de secuencia del ADN. Para secuenciar, se emplearon los *primers* Sp6/T7, FresEco81I/RresEco81I y seis *primers* internos (*secresF2/R2*, *secresF3/R3*, *secresF4/R4*) de forma de cubrir la totalidad

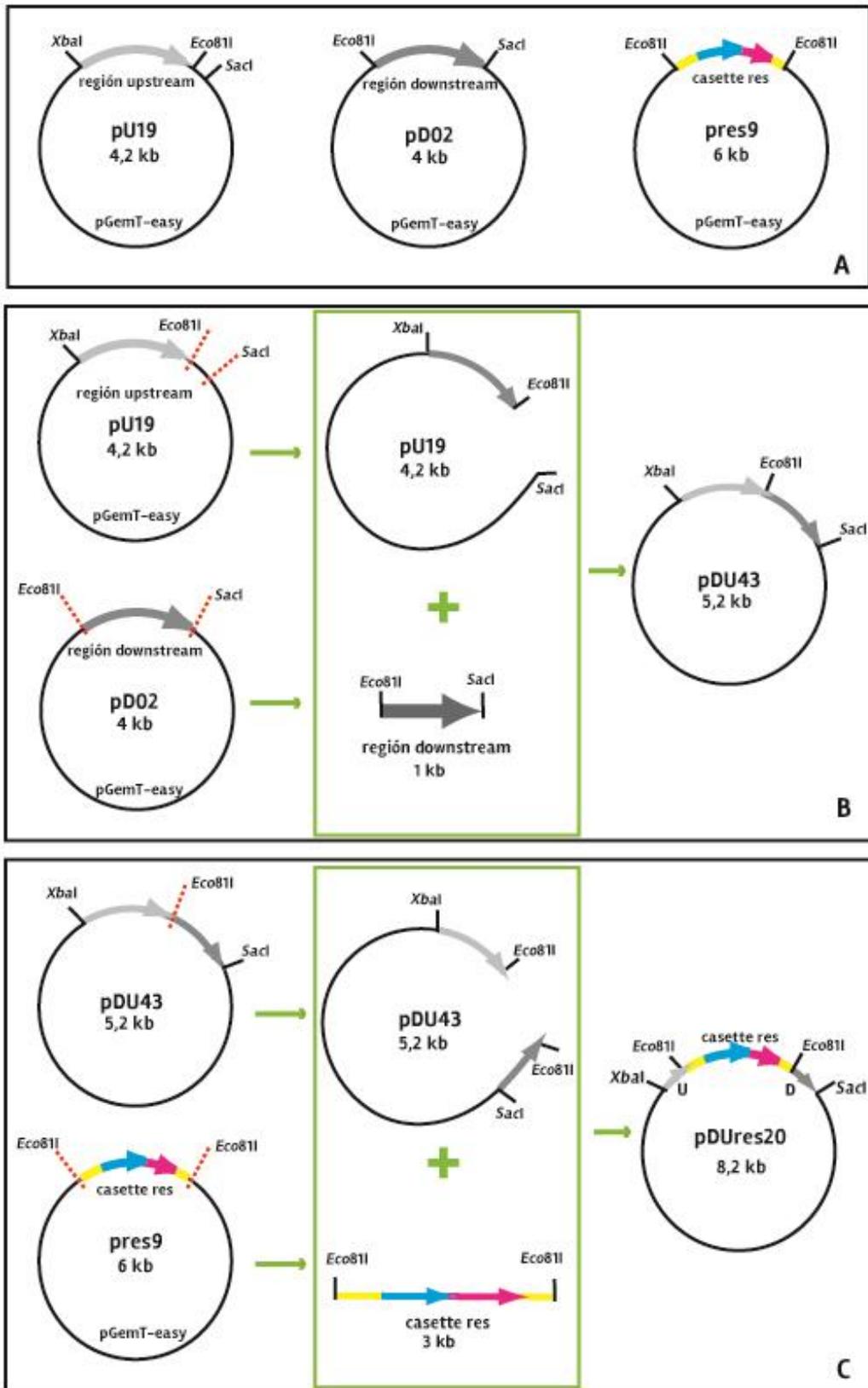


Figura 2.2. Esquema de la estrategia de construcción del vector empleado en la generación de la cepa reportera de *R. solanacearum* UY031. Todos estos pasos se llevaron a cabo en *E. coli* Top Ten. En A, región *upstream*, *downstream* y *cassette res* clonados en pGemT-Easy; B, subclonado de D en pU19; en C, subclonado del *cassette res* en el único sitio *Eco81I* de pDU43 para obtener el vector pDUres20, que posee la construcción deseada U-*cassette res*-D.

de los 3 kb del *cassette* en sentido *forward* y *reverse*. Los productos de secuenciación corroboraron la construcción, a la que se la denominó pRes9.

En una segunda etapa, se escindió el inserto de pD02 empleando las enzimas *Eco81I* y *SacI* y se subclonó en pU19. Se realizaron minipreps de 50 clones y se analizaron mediante PCR con los *primers* SP6/T7, para verificar la presencia del inserto de aproximadamente 2 kb. Se seleccionó uno de los clones y se verificó por doble digestión con la siguiente combinación de enzimas de restricción: *XbaI/Eco81I*, *Eco81I/SacI*, *XbaI/SacI* y digiriendo con cada una de las enzimas por separado. Para todos los casos, se obtuvieron los fragmentos de tamaño esperado y se confirmó la construcción, que se llamó pDU43 (Figura 2.2).

Finalmente, se clonó el *cassette res*, previamente digerido con *Eco81I*, en el único sitio *Eco81I* de pDU43 para obtener la construcción U-*cassette res*- D.

El vector resultante se nombró pDUres20. Se secuenció pDUres20 parcialmente con *primers* específicos (2UF_ *XbaI*, 2DR_ *SacI* y Fres *Eco81I*, Rres *Eco81I*). Se obtuvieron secuencias con 99% de identidad a la región U, región D y *cassette res* respectivamente. La doble digestión de pDUres20 con *Eco81I/XbaI* dió lugar a los fragmentos esperados (Figura 2.3)

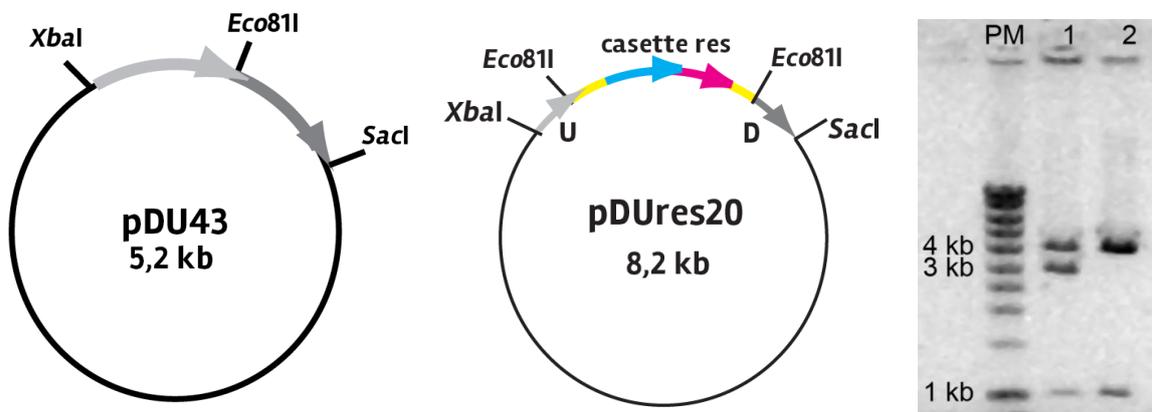


Figura 2.3. Restricción de pDUres20 y pDU43 con *Eco81I* y *XbaI*. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Carril (1) en la doble digestión de pDUres se escinde U (~1000 pb), res (~3000 pb) y el vector (~4000 pb); carril (2) doble digestión de pDU, se escinde U (~1000 pb).

La construcción pDures se introdujo por transformación natural en la cepa de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 UY031. Se obtuvieron más de 50 clones resistentes a Kanamicina. Se aislaron 10 clones escogidos al azar y guardaron a -70°C con glicerol. En todos los casos, los clones exhibieron un fenotipo típico en medio BG suplementado con TZC (Figura 2.4).

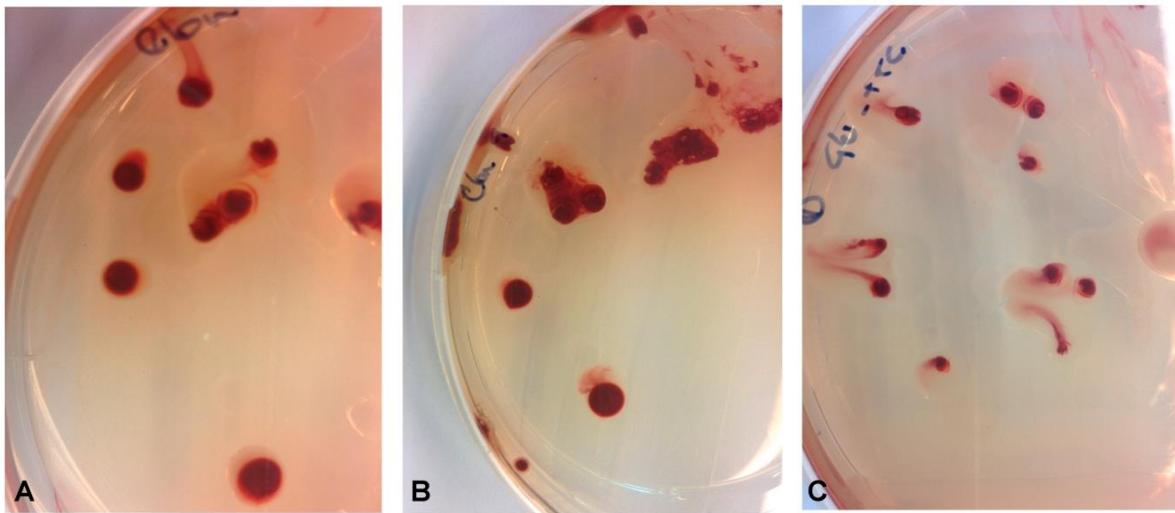


Figura 2.4. Fenotipo típico de un clon transformante *res* en agar BG suplementado con TZC. En A, B y C se observan colonias aisladas de los clones UY031_res9, UY031_res5 y UY031_res7 respectivamente.

2.3.3. Verificación de los clones transformantes *res* (cepa reportera) por PCR.

Se extrajo ADN de los clones UY031_res1-10. Se diseñaron *primers* para verificar la presencia del inserto en la zona 2, de forma tal que el primer *forward* hibride sobre la región U o la región externa a U y el primer reverse lo haga sobre el *cassette res*. De la misma manera se procede sobre la región D. En la Figura 2.5 se indica la posición de los *primers* que se emplearon para realizar los chequeos.

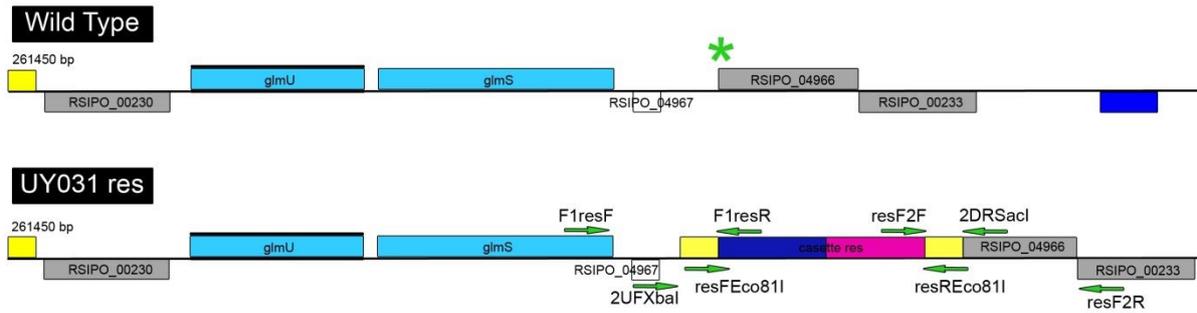


Figura 2.5. Mapa genético de *Ralstonia solanacearum* cepa IPO1609, en la región en la que se produce la inserción. En la parte superior se indica con un asterisco verde la región del genoma de la cepa *wild type* en la que se introdujo el *cassette res*. En la parte inferior, rotulada como UY031 res, se indica la ubicación del *cassette res* dentro del genoma de *R. solanacearum* y la posición de algunos *primers* relevantes para la verificación de la inserción.

La imagen fue modificada de la base de datos de *R. solanacearum* LIPM – INRA, Toulouse <https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>

El resultado de las PCR para los diez clones seleccionados fue el siguiente:

Tabla 2.5: Resumen de las PCR de verificación realizadas sobre los clones transformantes

Primers	Tamaño Esperado	pDUres20	UY031	clones										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
resFEco81l/ resREco81l	3 kb	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2UFXbal/ 2DRSacl	2,5kb para el WT 5 kb para los transformantes	*	+ 2,5 kb	*	*	*	*	2,5 +	2,5 +	*	*	*	*	*
F1resF/F1resR	1900 pb	Nc	Nc	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
2UF/ F1resR	1400 pb	+	Nc	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
F2resF/2DR	1550 pb	*	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
F2resF/F2resR	1629 pb	Nc	Nc	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

(*) - no amplificó en ninguna de las condiciones testeadas

(nc) - no corresponde

La lectura (+) amplificación positiva o (-) amplificación negativa se realizó siempre que los controles dieran lo esperado.

Para todos los casos se incluyó un control sin molde (blanco) y un control positivo en el caso de ser posible, ya que para los productos de los pares de *primers* 2UFXbal/2DRSacl, F1resF/F1resR, F2resF/F2resR, debido a que son mutantes construidos en este estudio, no contamos con controles positivos para testear las PCRs.

La optimización de estas PCR fue muy dificultosa e implicó el uso de distintas *Taq* polimerasas, estándar y de alta fidelidad y, de distintas temperaturas y tiempos de desnaturalización, *annealing* y elongación. Para los pares F2resF/F2resR y F2resF/2DR no fue posible optimizar las condiciones de amplificación, situación que se vio agravada para el par F2resF/F2resR ya que al no contar con un control positivo, la optimización se realizó a ciegas. El par de *primers* 2UFXbal/2DRSacl es un par muy informativo. Debido a que en el proceso de doble recombinación se elimina un fragmento genómico de 680 pb del ORF RSIPO_04966 y que los *primers* se ubican en las zonas adyacentes al *cassette* inserto, podemos tener al menos dos resultados para esta amplificación: a) el que se espera en la cepa WT, con un amplicón de 2,5 kb; b) el mutante, cuyo producto de amplificación debería ser de 5 kb aproximadamente. En el caso de que se dé un evento de simple recombinación, pueden coexistir los resultados a y b. Los controles dieron lo esperado bajo todas las condiciones ensayadas para la cepa *wild type* pero no se pudo amplificar bajo ninguna condición testeada el producto de mayor tamaño, ni en el plásmido pDUres20 (control positivo) ni en los clones transformantes.

Los productos de amplificación del clon 9 fueron secuenciados (no se muestran los datos) y presentaron un porcentaje de identidad mayor al 95% con la secuencia teórica esperada. Sobre el ORF RSIPO_04967 se observó una pequeña delección de unos 50 pb.

2.3.4. Verificación de la inserción del *cassette res* en los clones transformantes por *Southern Blot*.

El ADN genómico de los clones transformantes 1-4 y 6-10 fue digerido completamente con la enzima de restricción *Agel*. Esta enzima reconoce el sitio 5' ACCGGT 3' y lo corta dejando

extremos cohesivos. Este sitio está presente en las regiones U y D y, está ausente en el *cassette res* (Figura 2.6).

La sonda consistió en el *cassette res* marcado. Se esperaba observar una única banda de hibridación de aproximadamente 4,5 kb.

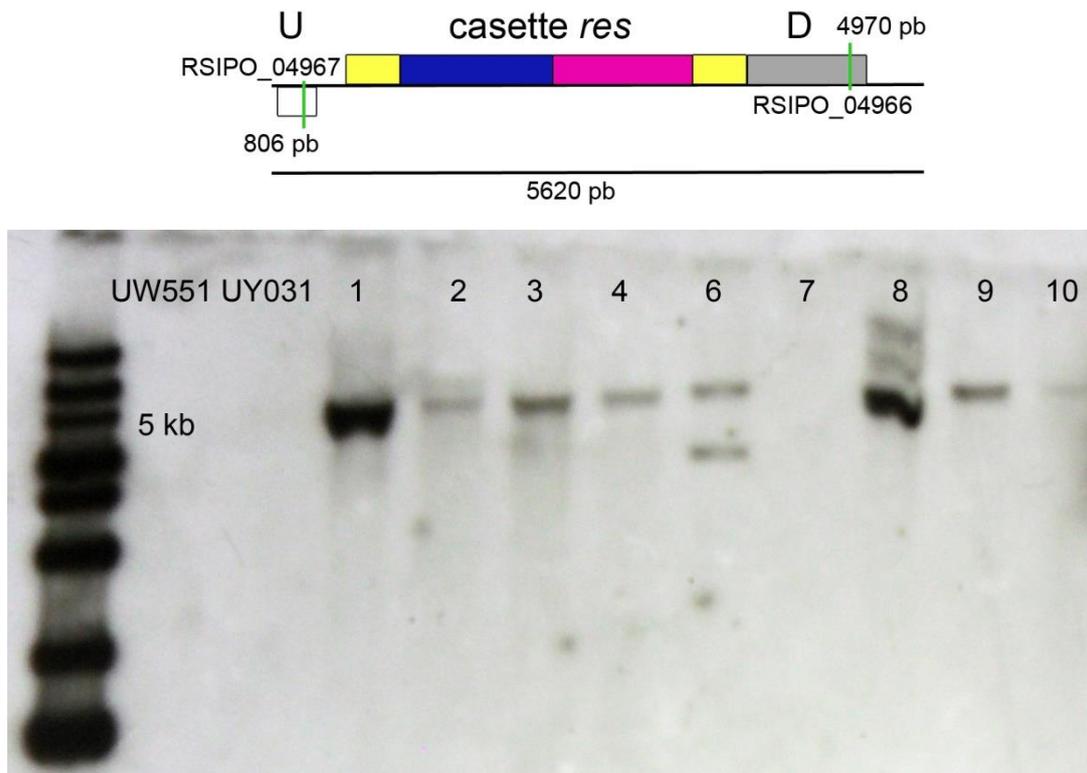


Figura 2.6. A: Esquema genético de la región de *R. solanacearum* en la que se produce la inserción. Se indica con la línea verde la posición relativa de los sitios de restricción de *AgeI*. B: *Southern Blot*: ADN genómico de los clones, digerido con *AgeI* y marcado empleando el *cassette res* como sonda.

Las cepas *wild type* UW551 y UY031 se emplearon como controles negativos. En ninguno de los casos se observó hibridación. En los clones 4, 9 y 10 se observa una única banda del tamaño esperado. En el clon 6 se observan dos bandas nítidas, por lo que se presume que se dieron dos inserciones. En el caso de los clones 1, 2, 3 y 8 el resultado no es claro, se observa un poco de ruido de fondo que podría ser atribuido a inserciones adicionales. Además parecería que la digestión del clon 8 fue parcial. Para el clon 7 no se observa hibridación con

la sonda. El clon 5 no fue incluido en el ensayo debido a que se descartó como cepa candidata a reportera en base a los resultados de las PCR.

Reuniendo los resultados obtenidos en el *Southern Blot* con los obtenidos en la verificación por PCR, se decide continuar trabajando con el clon 9.

2.3.5. Caracterización fenotípica del clon UY031_res9: Ensayo de agresividad en plantas de papa.

Una característica crítica en el comportamiento de la cepa reportera es su capacidad de infectar a la planta, que debe ser similar a la de la cepa *wild type*.

Para ver su comportamiento durante la infección, se evaluaron los síntomas de plantas de *Solanum tuberosum* inoculadas en la raíz con la cepa reportera, durante 9 días (hasta marchitez completa). Se inocularon 3 unidades experimentales por cada cepa (UY031_res9, la cepa UY031 y un control de agua) de 10 plantas cada una. La evaluación de los síntomas se realizó cada día, utilizando una escala ordinal que va de 0 (sin síntomas) a 4 (síntomas en toda la planta), tal como se explica en Materiales y Métodos.

En forma cualitativa, se observó a tiempo final que tanto las plantas inoculadas con la cepa UY031 como el clon UY031_res9 exhibían claros síntomas de enfermedad, en tanto el control se mantenía sin síntomas (Figura 2.7)

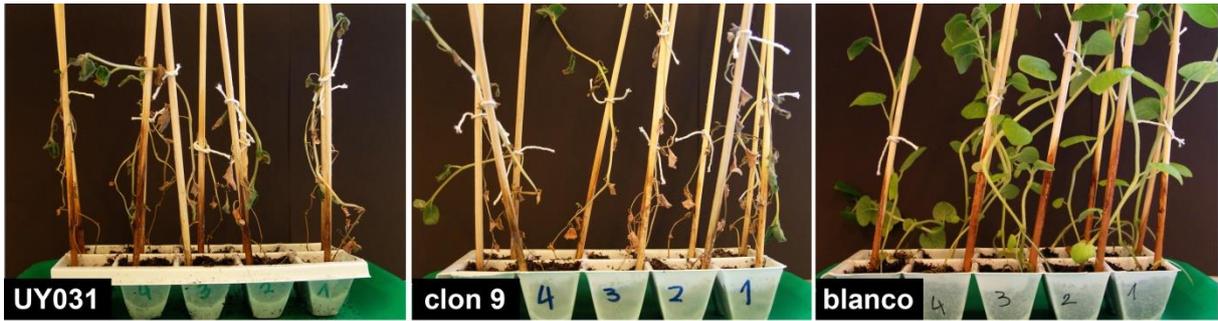


Figura 2.7: Fotografías de una unidad experimental de cada cepa y el control, donde se observan síntomas severos para la cepa *wild type* y el clon 9 y no se observan síntomas en el control de agua (blanco).

Se realizó el promedio de los síntomas para cada unidad experimental. Se graficó el avance de la enfermedad en función del tiempo.

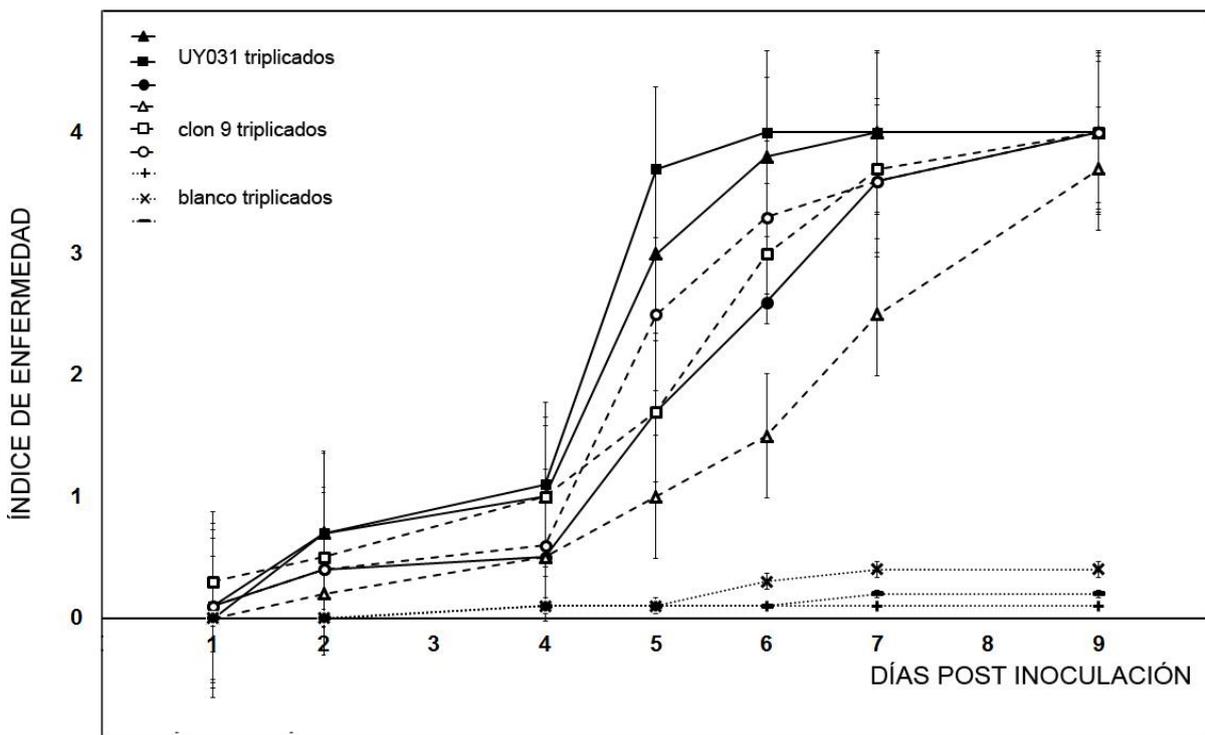


Figura 2.8: Curva del progreso de la enfermedad de *R. solanacearum* UY031 y clon UY031_res9 en plantas de papa. Se ensayó la cepa *wild type* UY031 (triplicados con línea llena: ■, ●, ▲) y el clon UY031_res9 (con guiones: ○, □, △), inoculando en suelo. Los blancos se marcan con línea punteada (+, -, x). El desarrollo de la enfermedad se registró durante 9 días, a intervalos regulares, con un índice de enfermedad que va de 0 a 4. Cada punto es la media del índice de enfermedad de 10 plantas que componen cada unidad experimental. La barra representa el error estándar de la media.

Se realizó el cálculo de AUDPC (área debajo de la curva) para determinar si existen diferencias significativas entre el clon transformante y la cepa *wild type*.

Tabla 2.6: Cálculo del AUDPC para cada réplica en estudio

Tratamiento	Cepa	Réplica	AUDPC
1	UY031	1	19,35
1	UY031	2	20,5
1	UY031	3	15,3
2	UY031res_9	1	11
2	UY031res_9	2	16,8
2	UY031res_9	3	16,8
3	Blanco	1	0,6
3	Blanco	2	1,55
3	Blanco	3	0,85

Mediante el Ensayo de Tukey, se puede afirmar que existen diferencias significativas entre los blancos y la cepa *wild type* y UY031res_9 (p- valor <0,05) pero no se observan diferencias significativas entre la cepa *wild type* y el clon 9 en su capacidad de enfermar a la planta.

2.3.5. Caracterización fenotípica del clon UY031_res9: Curva de crecimiento.

Se inocularon dos tubos de 5 mL de caldo TZC con UY031 y UY031res_9 (suplementado con Km este último), ajustándolos a una $DO_{600} \text{ inicial} = 0,02$ (Figura 2.9). Se observó que ambos cultivos presentaron una tasa de crecimiento similar en la fase exponencial. Hacia el final de la misma, UY031res_9 parecería crecer un poco más lento que la cepa WT, posiblemente debido a la presencia de antibiótico.

2.3.6. Verificación de la estabilidad del *cassette res* en el clon UY031_res9.

Se realizó un ensayo para verificar la estabilidad del *cassette res* en medio rico y medio mínimo, tal como se describe en materiales y métodos. En ambos casos, la resistencia se mantuvo en más del 94% de los clones analizados.

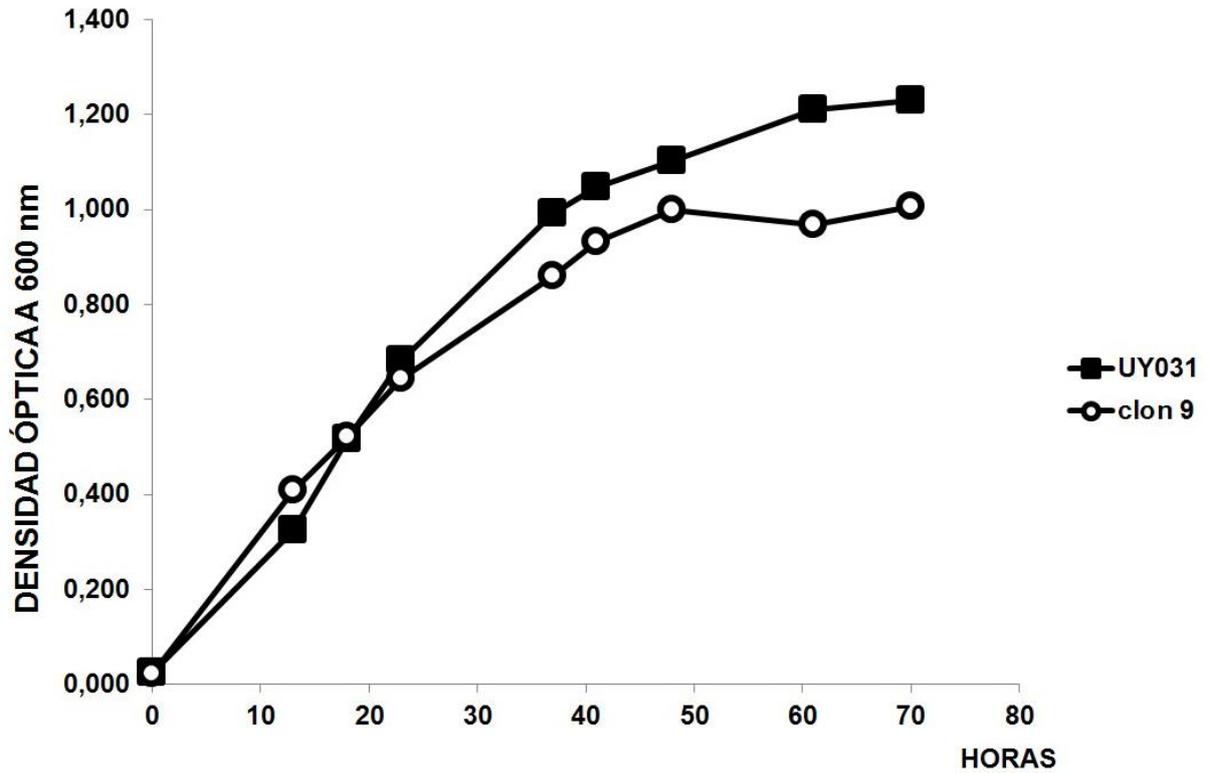


Figura 2.9: Curva de crecimiento de la cepa *wild type* UY031 (■) y del clon transformante UY031_res9 (○).

2.3.7. Crecimiento de UY031res_9 en medio rico suplementado con $\geq 10\%$ p/v de sacarosa.

En ambos medios (agar BG y Agar Nutriente), con cada una de las concentraciones de sacarosa usadas (10% p/v y 15% p/v) se observó al cabo de 48 hs crecimiento del clon UY031_res9 y de la cepa UY031 empleada como control. El aspecto de las colonias era el típico para *R. solanacearum*.

2.4. Discusión.

En este Capítulo se presentó la construcción de una cepa reportera de *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 (Filotipo IIB, cepa UY031) por introducción del *cassette res* (Camilli *et al.*, 1994) en una región neutra de genoma, para ser utilizada en la estrategia RIVET. La misma se caracterizó desde el punto de vista genotípico y fenotípico.

En un primer momento se planteó la introducción del *cassette res* en los genes *pme* y *ssd* de *R. solanacearum*, que codifican para la pectin – metilesterasa y para una descarboxilasa de síntesis de sideróforo, respectivamente. Los estudios funcionales realizados sobre estos genes en cepas de *R. solanacearum* descritos en la bibliografía indicaron que no son esenciales para la virulencia y que sus mutantes *knock out* retienen la capacidad de enfermar a la planta (Tans - Kersten *et al.*, 1998; Bhatt y Denny, 2004). Sin embargo, no fue posible construir una cepa reportera empleando estos genes como target (ver Anexo I) y se hizo necesario explorar el genoma de la bacteria para buscar una nueva región para introducir el *cassette*.

El Dr. Marc Valls, que tiene una amplia experiencia en *R. solanacearum*, mediante una comunicación personal, nos presentó la región *downstream* al gen *glmS* como una zona atractiva para introducir el *cassette*. Esta región presenta las siguientes características: a) es una región neutra del genoma de la bacteria y puede ser interrumpida sin afectar la capacidad infectiva de la cepa; b) es una región lo suficientemente grande para facilitar la construcción para la inserción; c) los ORF de esta región son de función desconocida y no presentan homología con ningún gen ya descrito presente en otras razas de *R. solanacearum* o en otros microorganismos.

Esta región fue empleada en estudios de complementación de mutantes de *R. solanacearum* cepa K60 (raza 1, filotipo IIA) en la década pasada, ya que presenta un único sitio para la inserción estable del mini -Tn7 (Yao y Allen, 2007).

En el transcurso de esta tesis, el grupo del Dr. Valls desarrolló una serie de herramientas moleculares para dirigir la inserción estable de construcciones en esta zona en distintas razas de *R. solanacearum* (Monteiro *et al.*, 2012 B). Estas herramientas, dirigidas a la región *downstream* a *glmS* (identificada como región 2 en este Capítulo) se han usado con éxito (Monteiro *et al.*, 2012 B; Zuluaga *et al.*, 2013; Lohou *et al.*, 2014), demostrando que las inserciones en esta región son estables y no afectan la capacidad de la bacteria de enfermar la planta.

En esta región se introdujo el *cassette res* por transformación natural. Se escogieron 10 clones transformantes en los que se confirmó por PCR la inserción del *cassette*, empleando un conjunto de *primers* que cubren la inserción y las zonas flanqueantes (Tabla 2.5).

Los resultados de los ensayos de PCR, tomados en conjunto, indican que: los clones 1, 2, 5 y 7 no evidencian la inserción del *cassette res* pese a su habilidad para crecer en medio TZC suplementado con kanamicina. El clon 6 presentó un perfil de amplificación similar al de la cepa WT para el par de *primers* 2UFXbal/2DRSacl pero amplificó un fragmento de 1900 pb y otro de 1400 pb con los *primers* F1resF/F1resR y 2UF/F1resR respectivamente, lo cual es esperable para las cepas mutantes. Esto podría indicar que se habría producido un evento de simple recombinación, resultado de la cointegración del *cassette* junto con el vector pGem T-Easy. Finalmente, los resultados a partir de los clones 3, 4, 8, 9 y 10 corresponden a los esperados para la cepa reportera, siendo el más alentador el clon 9, ya que fue el único a partir del cual se logró amplificar el *cassette* entero. En base a estos resultados se descartó el

clon 5, pues en todas las reacciones de amplificación desarrolladas se comportó como una cepa *wild type*.

En la verificación por PCR no fue posible optimizar las amplificaciones con los pares de *primers* F2resF/2DR y F2resF/F2resR. Esto podría deberse a que haya habido algún tipo de deleción en el borde derecho del ORF RSIPO_04966 durante la doble recombinación, que impida la correcta hibridación del primer 2DR. El ORF RSIPO_00233 exhibe diferencias de secuencia entre las distintas cepas secuenciadas de *R. solanacearum* r3bv2 (IPO1609 y UW551). Por otra parte, el primer F2resR está ubicado en una zona altamente repetida dentro del genoma de *R. solanacearum* y no contamos con ningún control positivo para optimizar la amplificación a partir del par F2resF/F2resR. Se diseñaron distintos primers alternativos a este primer (no se muestra dato) pero no se logró obtener un producto de amplificación con ninguno de ellos. Por todos estos motivos, no fue posible verificar por PCR el borde derecho de la región analizada (Figura 2.5).

Los clones 1-4 y 6-10 se verificaron por *Southern Blot*. Se digirió el genoma de cada una de las cepas con la enzima *Agel* y se hibridó con el *cassette res* marcado. Este ensayo permite asegurar que el *cassette* está presente en única copia, pero no brinda información sobre la región en la que se encuentra ni si se trata de un doble recombinante o de la formación de un cointegrado. En los clones 4, 9 y 10 se observa una única banda del tamaño esperado.

Considerando en conjunto todos los datos, se decide continuar trabajando con el clon 9. Para descartar la posibilidad de que se haya cointegrado el plásmido junto con el *cassette res* en el borde derecho (debido a que no se pudieron optimizar las amplificaciones con los pares de *primers* F2resF/2DR y F2resF/F2resR) se realizaron PCRs adicionales combinando los *primers* 2UF, 2DR y F2resR con SP6 y T7 (no se muestran los datos). En ningún caso se

obtuvieron resultados consistentes con la presencia de restos del vector en el clon transformante.

El clon 9, de aquí en más UY031_res9, en el marco de la estrategia RIVET, debe cumplir por sobre todas las cosas con un requerimiento, y es el de ser capaz de enfermar a la planta de la misma manera que la cepa UY031 (*wild type*). Por ello se realizó un ensayo de agresividad de ambas cepas en plantas de papa. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la agresividad de ambas cepas.

Se analizaron otras características fenotípicas del clon UY031_res9: el crecimiento en placa de la cepa UY031_res9 no se diferenció del de la cepa WT (Figura 2.4). La curva de crecimiento en caldo BG demuestra que la tasa de crecimiento de ambas cepas es similar.

También se llevó a cabo un ensayo para testear la estabilidad del *cassette*. Dado que numerosos trabajos citados previamente (Monteiro *et al.*, 2012 B; Zuluaga *et al.*, 2013; Lohou *et al.*, 2014), indican que la región en la que está inserto el *cassette* es permisiva y que el *cassette* ya ha sido empleado en forma estable en otros estudios de RIVET (Camilli *et al.*, 1994; Osorio *et al.*, 2005; Tamir – Ariel *et al.*, 2007), no se esperaba que hubiera variaciones a los antecedentes previos. Si bien el número de colonias analizado fue bajo, tanto en medio rico BG como en el medio mínimo de Boucher la estabilidad del *cassette* fue igual o superior al 94%.

Finalmente, se contrastó el crecimiento de la cepa WT y de UY031res_9 en medio rico (agar BG y Agar Nutriente) suplementado con 10% p/v de sacarosa. Contrariamente a lo esperado, ambas cepas fueron capaces de crecer al cabo de 48 horas, afectando el uso de *sacB* como marcador positivo.

El gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que codifica para la levansucrasa, otorga a la bacteria que lo posee sensibilidad a altas concentraciones de sacarosa. El producto del gen *sacB* convierte la

sacarosa en levan, que se acumula en el periplasma y es tóxico para las bacterias Gram negativas (Russell y Dahlquist, 1989). En la estrategia RIVET se suele emplear como marcador positivo, ya que luego del proceso de resolución del *cassette res* mediado por TnpR, el gen se elimina de la cepa reportera y la misma pasa a ser resistente a altas concentraciones de sacarosa (Sac^R). Su uso está muy extendido en bacterias Gram negativas como contra-selección (Pelicic *et al.*, 1996; Reyrat *et al.*, 1998; Kamoun *et al.*, 1992) incluso en bacterias del género *Ralstonia* (Craig *et al.*, 2009; Kleihues *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha sugerido que su uso puede ser problemático en algunos sistemas ya que se ha visto la ocurrencia de mutantes resistentes a *sacB* en forma espontánea con frecuencias de hasta un 50%, ya sea debido a factores ambientales (temperatura, composición del medio) como la orientación del gen dentro del *cassette* (Wu y Kaiser, 1996). Aún más, durante el proceso de construcción de la cepa reportera, fue publicado que se desaconseja el uso de *sacB* en el estudio de bacterias asociadas a plantas, ya que la sacarosa es un elemento abundante en el xilema y la expresión de *sacB* podría interferir con la colonización normal del tejido vegetal (Lozano *et al.*, 2011). Debido a que el gen no es funcional en nuestra cepa reportera, no se empleará la resistencia a altas concentraciones de sacarosa como marcador positivo en este estudio.

Independiente de este punto, la caracterización genotípica y fenotípica del clon UY031_res9 permite concluir que posee las características apropiadas para ser empleado como cepa reportera en la estrategia RIVET. En los siguientes Capítulos se la citará como UY031_res para simplificar la nomenclatura.

Tanto la verificación de los clones transformantes por PCR como el ensayo de agresividad en plantas de papa fueron realizados en conjunto con el Bq. Clin. Matías Salvo en el marco de una pasantía por créditos para la obtención de su título de grado. El análisis estadístico sobre la curva de progreso de enfermedad fue llevado a cabo por María Inés Lapaz y María Inés Siri.

Construcción de la genoteca de *Ralstonia solanacearum* UY031 en el plásmido pBamSL9.

Resumen

Para llevar a cabo la estrategia RIVET se debe introducir una genoteca del microorganismo en estudio en la cepa reportera. En este Capítulo se presenta la construcción de la genoteca, así como también la construcción de controles positivos y negativos que permiten testear el sistema en estudio.

Las construcciones se llevaron a cabo exitosamente, no así su introducción en la cepa reportera. Estos resultados reorientaron la tesis a un cambio en la estrategia propuesta, que se presenta en el Capítulo 4.

3.1. Introducción

El siguiente paso en el esquema general de la estrategia RIVET abarca la introducción de una biblioteca genómica de *R. solanacearum* en la cepa reportera (Figura 1.7 y 1.8). Para la construcción de la genoteca se emplea un vector suicida en *R. solanacearum*, es decir, un plásmido que no puede replicarse en la cepa reportera, por lo cual si no se co-integra mediante el inserto que presenta identidad al genoma de la bacteria, el vector se pierde. Se busca que el inserto se clone *upstream* a un gen marcador sin promotor, de manera que si

en ese inserto se encuentra un promotor inducible, dicha inducción pueda ser monitoreada mediante algún cambio fenotípico en la cepa reportera.

El vector pSLBam9 (Figura 3.1), generado por el laboratorio del Dr. Saúl Burdman, es un plásmido de espectro de hospedero reducido, replicable en bajo número de copias que deriva de pJP5603. Su origen de replicación es R6K, que es estrictamente dependiente de la proteína π (codificada por el gen *pir*) para que el plásmido se mantenga episomal (Stalker *et al.*, 1979). En las bacterias que carecen del gen *pir*, como *R. solanacearum*, el plásmido se puede integrar si existe una zona de homología con el genoma bacteriano, de otra manera, se pierde. Por esta razón, el plásmido pSLBam9 es un vector “suicida” en esta bacteria.

El plásmido cuenta además con un gen de resistencia a cloranfenicol, que actúa como gen marcador y con la fusión transcripcional *tnpR-uidA* sin promotor. El gen *tnpR* codifica para la enzima resolvasa, que proviene de trasposon Tn- $\gamma\delta$. Esta enzima, involucrada en los procesos de transposición, es capaz de reconocer la secuencia *res*, presente en el *cassette res* de la cepa reportera (Capítulo 2), y escindirla (Reed y Grindley, 1981). El gen *uidA*, por otro lado, codifica para la enzima β -glucuronidasa de *E. coli*. Esta hidrolasa cataliza la ruptura de varios β -glucurónidos que pueden ser adquiridos comercialmente, como el X-gluc, y que al ser cortados dan lugar al desarrollo de color que puede ser monitoreado colorimétricamente o fluorimétricamente (Jefferson, 1987). En la región *upstream* a la fusión transcripcional, se indica con un Ω los codones stop en los tres marcos de lectura, para impedir la traducción inespecífica de *tnpR-uidA*. También en esa región se encuentran los sitios de restricción únicos *SacI*, *BamHI* y *XhoI*.

La idea general de la estrategia es clonar fragmentos del genoma de *R. solanacearum* en pSLBam9, en la región *upstream* a la fusión transcripcional e introducir la genoteca en la cepa reportera. Debido a que estos fragmentos tienen un homólogo en el genoma de la cepa

reportera, pRIV (pSLBam9 recombinante que contiene a la genoteca) se integrará por la zona de homología. El *pool* de cepas resultantes será resistente a kanamicina y cloranfenicol; pero si en esos fragmentos están contenidos promotores que se estén expresando, estos dirigirán la expresión de la resolvasa y la β -glucuronidasa. Esta expresión va a ocasionar la escisión irreversible del *cassette res* y por consiguiente la pérdida de resistencia a kanamicina, se dice entonces que las cepas se ‘resuelven’. Además, puede monitorearse colorimétricamente la actividad β -glucuronidasa sobre X-gluc. De esta manera, TnpR actúa como una trampa, capturando promotores. Los promotores que se expresan constitutivamente resuelven el sistema durante el proceso de selección de la biblioteca de transconjugantes de pRIV en la cepa reportera. El *pool* de cepas transconjugantes resistente a kanamicina y cloranfenicol se emplea para infectar a *Solanum tuberosum*. Luego de la aparición de los primeros síntomas, se recuperan de la planta las cepas que son resistentes a cloranfenicol y sensibles a kanamicina. Los promotores clonados *upstream* a *tnpR-uidA* se caracterizan y se consideran promotores que se expresan *in vivo* (*in vivo expressed, IVX*).

Si bien no existen antecedentes de la aplicación de RIVET en el estudio de la interacción *R. solanacearum* – hospedero, sí está descrito en bibliografía el uso de vectores suicidas del tipo R6K en *R. solanacearum* (Hernández-Romero *et al.*, 2005).

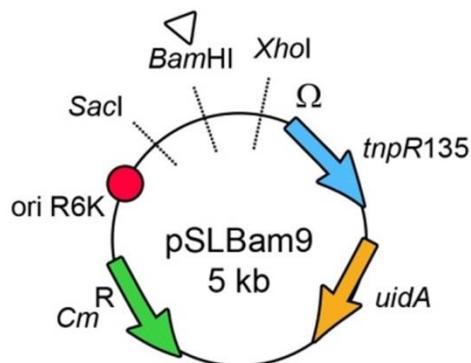


Figura 3.1. Mapa del plásmido pSLBam9. Las flechas indican los genes y su orientación. El círculo es el origen de replicación. Se marca con línea punteada los sitios únicos de restricción *upstream* a la fusión transcripcional *tnpR-uidA*. La letra Ω señala la posición de los codones stop en los tres marcos de lectura.

Para verificar que todo el sistema funciona, es necesario construir controles. Para ello es conveniente clonar *upstream* a la fusión transcripcional, promotores de comportamiento conocido. El *cluster hrp*, que codifica para el sistema de secreción de tipo III (TTSS) ya ha sido descrito detalladamente en el Capítulo 1 de esta tesis (1.3.2, Figura 1.4). Está documentado que los genes del *cluster hrp* se inducen en medios mínimos que simulan los fluidos apoplásticos de la planta (Van Gijsegem, 1997). Los genes de este *cluster* están bien caracterizados en *R. solanacearum* (Boucher *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1999; Van Gijsegem *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2002; Cunnac *et al.*, 2004 A; Valls *et al.*, 2006), por lo cual sus promotores resultan atractivos como candidatos para controlar el funcionamiento del sistema TnpR – *cassette res* construido en el contexto de la estrategia RIVET *in vitro* e *in vivo*. Se escogieron como controles para el sistema RIVET en desarrollo los promotores de los genes *hrpG* y *hrpB*. HrpG es un componente central en la regulación del *cluster*, ya que integra distintas señales, principalmente de la planta, y activa a HrpB, que regula la expresión de los genes del aparato del TTSS (Figura 1.4). Debido al rol que cada una de estas proteínas reguladoras cumple dentro del *cluster*, es que *hrpG* presenta una expresión basal en medio nutriente (que simula condiciones constitutivas) y en medio mínimo, aunque su mayor expresión es en la planta (Brilo *et al.*, 1999). Por otro lado, *hrpB* se expresa solamente en medio mínimo y en la planta (Brilo *et al.*, 1999; Genin *et al.*, 1992). Esa expresión diferencial de *hrpG* y *hrpB* en medio nutriente y medio mínimo puede ser explotada: el promotor de *hrpG* deberá resolver el *cassette res* cuando se trabaje con medio mínimo o nutriente en tanto el promotor de *hrpB* solo lo hará en condiciones nutricionales pobres que simulen las condiciones de la planta. Además de clonar cada uno de estos promotores *upstream* a la fusión transcripcional *tnpR-uidA*, se propone clonarlos en la orientación invertida, relativa a *tnpR-uidA*. Esta construcción puede usarse como un control negativo del

sistema: con los promotores en una orientación errónea, *tnpR* no podrá expresarse y el *cassette* no será escindido de la cepa reportera.

En este Capítulo se presenta la construcción de la genoteca de *R. solanacearum* UY031 en pBamSL9 y los vectores control para verificar el funcionamiento del sistema planteado.

3.2. Materiales y métodos.

3.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios.

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados se resumen en la Tabla 3.1. Los medios empleados y los suplementos agregados se detallan en el ítem 2.2.1 del Capítulo 2 de esta tesis.

3.2.2. Diseño de *primers*, optimización de las reacciones de amplificación y análisis de las secuencias.

El diseño de *primers* y la optimización de las reacciones de amplificación se llevó a cabo tal como se describe en el ítem 2.2.2 del Capítulo 2 de esta tesis. En algunos sets de *primers* se incluyeron los sitios de restricción que se indican con color (Tabla 3.2). La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en IDT (USA) y en Hy Laboratories (Israel). De la misma manera, para el análisis de las secuencias, se procedió tal como indica el ítem 2.2.3.

3.2.3. Construcción de los vectores control en la estrategia RIVET.

Se partió del codón de inicio ATG de los genes *hrpG* y *hrpB* (teniendo en cuenta su orientación dentro del operón) y se diseñaron *primers* en la zona comprendida entre el codón de inicio y unos 500 pb de bases *upstream* al mismo, de forma de abarcar la zona en la que se encuentra presumiblemente el promotor de cada gen. Se optimizó la amplificación de los pares de *primers* PhrpGF/R y PhrpBF/R mediante PCR con gradiente, variando la temperatura de *annealing* (hibridación) entre 60°C y 70°C. El ciclo de amplificación fue el siguiente: una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 9 minutos, seguida de

treinta ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, *annealing* por dos minutos y extensión a 72°C por tres minutos. Por último se realizó una extensión final de 10 minutos. La mezcla de reacción se realizó empleando RedTaq Ready Mix (Sigma Aldrich, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorff, Alemania). El producto de amplificación para cada gen fue purificado a partir de la banda de la corrida electroforética en gel de agarosa con el kit de Real Biotec Corporation (Taipei, Taiwan). Los promotores de *hrpB* y *hrpG* fueron ligados en los vectores T pGEM T-Easy (Promega, EEUU) y pZT57R/T (Fermentas – Thermo Scientific, Canadá) respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 3.2). La mezcla de ligación se precipitó con ARNt de levadura (Zhu y Dean, 1999) y se transformó mediante células electrocompetentes de *E. coli* TopTen. Se seleccionaron clones transformantes blancos y se extrajeron los plásmidos, que se verificaron por restricción con la enzima *Bam*HI (Fermentas - Thermo Scientific, Canadá), por amplificación mediante PCR con los *primers* SP6/T7 y por análisis de secuencia. A los plásmidos construídos y confirmados se les denominó pPhrpG y pPhrpB.

A los pares de *primers* PhrpGF/R y PhrpBF/R se les incluyó el sitio de restricción *Bam*HI, para la posterior subclonación de los productos de amplificación en pSLBam9. El plásmido pSLBam9 posee un único sitio *Bam*HI *upstream* a la fusión transcripcional *tnpR-uidA*. Se digirió pSLBam9 con esta enzima de restricción, se desfosforiló con fosfatasa alcalina CIAP (Invitrogen, Estados Unidos) y el fragmento de ADN se purificó a partir de la corrida electroforética en gel de agarosa con el kit de Real Biotec Corporation (Taiwan). En paralelo, se digirió pPhrpG y pPhrpB con *Bam*HI para obtener dos fragmentos: uno de 3 kb que corresponde al vectorT y otro de unos 500 pb que corresponde a la región promotora insertada.

Tabla 3.1: Resumen de cepas y plásmidos empleados en la construcción de la genoteca y los vectores control.

Cepa/Plásmido		
Nombre	Características	referencias
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
UY031_res	UY031 <i>res cassette</i> Km ^R Suc ^S Amp ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> S17 λpir	λ lisogénica derivada de S17-1; produce proteína π para la replicación de plásmidos con <i>oriR6K</i> ; <i>recA pro hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7λ -pir	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>pro, leu, thi, lacY, Sm^R, endoI⁻, recA⁻, hsrA⁻, hsm⁻</i>	Boyer y Roulland – Dussoix, 1969
Plásmidos		
Nombre	Características	Referencia
pGEM T-Easy	Ap ^R , Vector de clonado con overhangs 3' T	Promega
pZT57R/T	Ap ^R , Vector de clonado con overhangs 3' T	Fermentas
pPhrpG	Ap ^R , pZT57R/T con el promotor <i>hrpG</i> clonado	Este estudio
pPhrpB	Ap ^R , pGEM T-Easy con el promotor <i>hrpB</i> clonado	Este estudio
pSLBam9	Cm ^R , pJP5603 con el gen Km ^R reemplazado por Cm ^R , con la fusión <i>tnpR-uidA</i> sin promotor y un sitio BamHI <i>upstream</i> a la fusión	Burdman, comunicación personal
pRIV	Cm ^R , vector pSLBam9 que se emplea en la genoteca de <i>R. solanacearum</i> UY031 para la estrategia RIVET	Este estudio
pRIVPhrpG	Cm ^R , región de 500 pb del promotor <i>hrpG</i> clonado en la orientación correcta, relativa a <i>tnpR-uidA</i>	Este estudio
pRIVPhrpB	Cm ^R , región de 425 pb del promotor <i>hrpB</i> clonado en la orientación correcta, relativa a <i>tnpR-uidA</i>	Este estudio
pRIVPhrpG ^{rev}	Cm ^R , región de 500 pb del promotor <i>hrpG</i> clonado en la orientación invertida, relativa a <i>tnpR-uidA</i>	Este estudio
pRIVPhrpB ^{rev}	Cm ^R , región de 425 pb del promotor <i>hrpB</i> clonado en la orientación invertida, relativa a <i>tnpR-uidA</i>	Este estudio
pLAFR6	Cósmido de amplio espectro que contiene terminadores transcripcionales que flanquean el sitio múltiple de clonado. Derivado de pLAFR1. Tc ^R , aprox. 22 kb.	D. Dahlbeck y B. Staskawicz, no publicado
pRK2073	Sp ^R , <i>mob⁻, tra⁺</i>	Figurski y Helsinski, 1979

Tabla 3.2: *Primers* usados

Primers		
Nombre	Secuencia	Referencia
PhrpGF	GATC GGATCC CATGGCGTTCCCCGTTTC (*)	Este estudio
PhrpGR	GATC GGATCC TCGACTACGGCATCGTCAC (*)	Este estudio
PhrpBF	GATC GGATCC GACCGACTCGATCTTCTCCA (*)	Este estudio
PhrpBR	GATC GGATCC CATGGCAATGCTCCTGAAG (*)	Este estudio
RtnpRIVET	CTTTCCGATCGC ATGAACTG	Tamir-Ariel <i>et al.</i> , 2007
tnpF	TACCAATGAAGGTCGCCAAG	Este estudio
FtnpRIVET	GTGCTGCAAGGCGATTAAGT	Este estudio
hrpBUF	ACAGGTGAAGCAAGGATTGG	Este estudio
hrpBDR	CGAGTCAGATGCATGATGGT	Este estudio
hrpGUF	AGCGTTGAAACCGTCAAATC	Este estudio
hrpGDR	ACGTTTTTCGTAATCGCCATC	Este estudio

(*) Se indica con color rojo, el sitio de restricción *Bam*HI, con verde, los *overhangs* para el apoyo de la enzima de restricción. El color azul marca el codón de inicio de *hrpG* y *hrpB* respectivamente.

En cada caso se purificó el fragmento de menor tamaño a partir de la banda de la corrida electroforética en gel de agarosa. Este fragmento se clonó en el único sitio *Bam*HI de pSLBam9, ligándolo con T4 Ligasa (New England Biolabs, EEUU) ON a 16°C. La mezcla de ligación se precipitó con ARNt de levadura (Invitrogen, EEUU) de acuerdo al protocolo de Zhu y Dean (1999), previo a la transformación en *E. coli* S17 λ pir por electroporación. Se extrajeron los plásmidos de unos 40 clones transformantes para cada promotor y se verificó la presencia del inserto mediante PCR con el par de *primers* FtnpRIVET/RtnpRIVET, que se ubican sobre pSLBam9, hacia la derecha del sitio *Bam*HI y sobre *tnpR* respectivamente (por fuera del inserto). El tamaño esperado del fragmento amplificado es de aprox. 600 pb. En los

plásmidos con inserto se determinó la orientación del inserto empleando el par de *primers* PhrpGF/RtnpRIVET o PhrpBF/RtnpRIVET según el caso. Si el inserto está en la orientación correcta con respecto a *tnpR*, se obtiene un producto de amplificación de aprox 600 pb, en tanto si el inserto está en la orientación reversa, el amplicón es de 100 pb. Se seleccionó para cada promotor un plásmido con la orientación correcta y uno con la reversa. Se confirmó la secuencia y la orientación del fragmento por análisis de secuencia. Estos plásmidos se nombraron como pRIVPhrpG, pRIVPhrpB, pRIVPhrpG^{rev} y pRIVPhrpB^{rev} y fueron usados como controles de la estrategia RIVET.

3.2.4. Construcción de la biblioteca genómica de *R. solanacearum* UY031 en pSLBam9.

Se extrajo ADN genómico de *R. solanacearum* UY031 a partir de 50 ml de cultivo celular, se realizó un tratamiento con ARNasa y se precipitó para obtener ADN genómico concentrado y de buena calidad. Se digirieron parcialmente 4,5 µg de manera de obtener una mayor proporción de bandas entre 1 y 3 kb de tamaño, empleando *BfuCI* (New England Biolabs, EEUU), un isoquizómero de *Sau3AI*, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para ello, se optimizó la concentración de enzima a emplear y el tiempo de incubación, siguiendo la estrategia planteada por Uchiyama y Watanabe (2007). Se purificó a partir de la corrida electroforética en gel de agarosa el fragmento de ADN que corresponde a los tamaños entre 1 y 4 kb, con el kit QIAquick (Quiagen, Alemania).

En paralelo, se digirió 1 µg de pSLBam9 con *BamHI* (New England Biolabs, EEUU), hasta digestión total, en las condiciones indicadas por el fabricante. Luego, se desfosforiló con la enzima fosfatasa alcalina CIAP (Invitrogen, EEUU) durante 30 minutos a 37°C y se inactivó a 65°C durante 15 minutos. La banda única de 5 kb se purificó a partir del gel de agarosa empleado en la corrida electroforética con el kit QIAquick (Quiagen, Alemania).

Finalmente (Figura 3.3) se realizó una semicuantificación por comparación con el marcador de peso molecular de concentración conocida de los productos purificados (genómico digerido y plásmido) y se ligaron por duplicado, en una relación 1:5 con T4 ligasa (Fermentas - Thermo Scientific, Canadá), incubando ON a 16°C. La mezcla de ligación se precipitó con ARNt de levadura (Invitrogen, USA), empleando el doble de la concentración de ARNt recomendada en el protocolo de Zhu y Dean (1999), previo a la transformación por electroporación en *E. coli* S17 λpir.

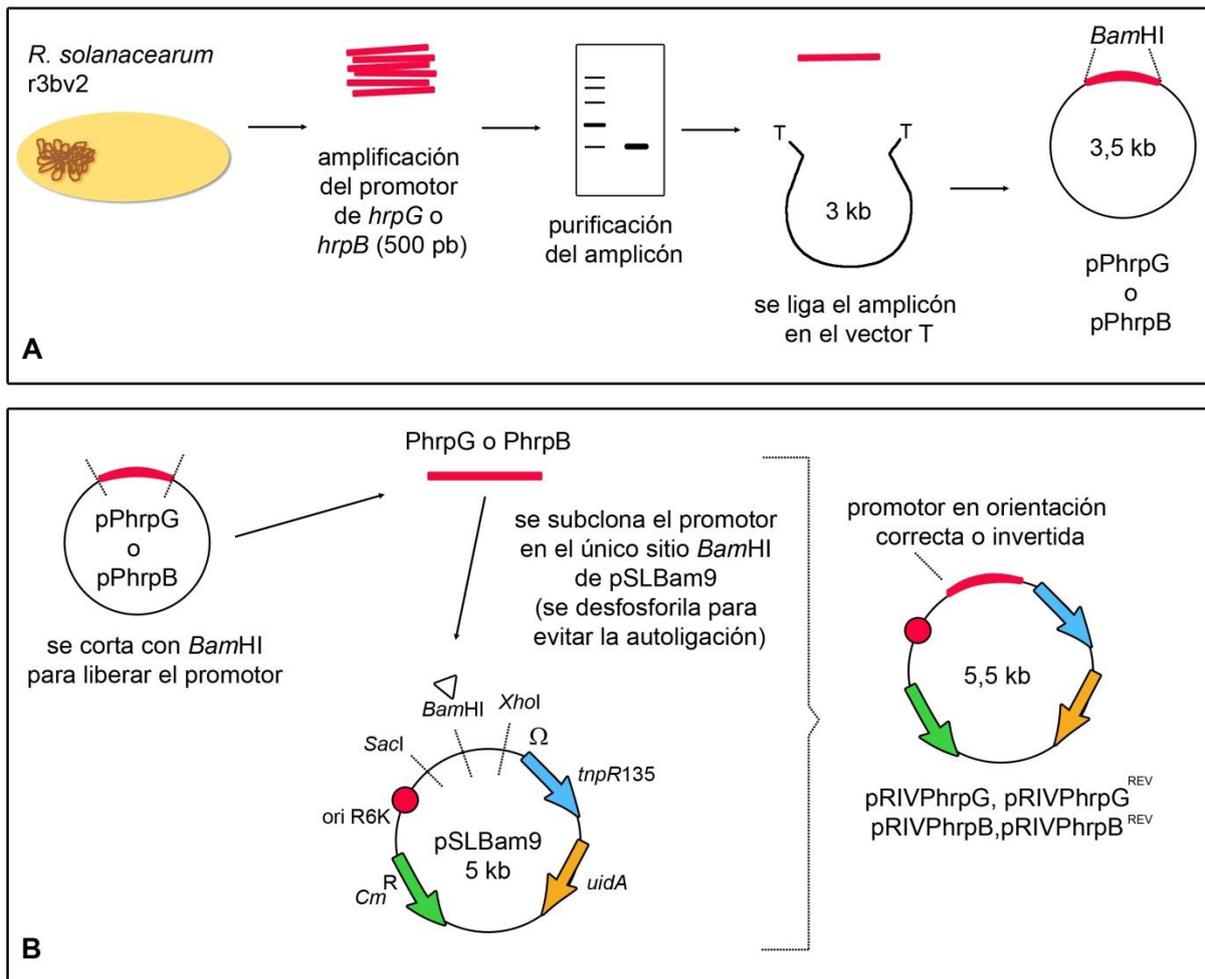


Figura 3.2. Esquema de la estrategia de construcción de los plásmidos control empleado en la estrategia RIVET. Todos estos pasos se llevaron a cabo en *E. coli* Top Ten. En A: se extrae el ADN de *R. solanacearum* UY031, se amplifican los promotores de *hrpG* y *hrpB* y se clonan en un vector T para obtener pPhrpG o pPhrpB; en B: a partir de pPhrpG o pPhrpB se escinden los promotores mediante una restricción con *Bam*HI y se subclonan en el único sitio *Bam*HI de pSLBam9. Se obtienen así los plásmidos control pRIVPhrpG, pRIVPhrpB, pRIVPhrpG^{REV} y pRIVPhrpB^{REV}.

En todas las transformaciones se realizaron controles positivos (células sin ADN electroporadas y plaqueadas en un medio sin selección para confirmar su viabilidad) y negativos: células sin ADN electroporadas y plaqueadas en un medio con Cm para verificar la ausencia de contaminación así como un control de religación de pSLBam9 desfosforilado y ligado (para confirmar que la desfosforilación ocurrió apropiadamente).

Para cada una de las ligaciones, se plaquearon 100 μ L y el resto de la suspensión de bacterias electroporadas en LB agar suplementado con Cm. A las dos genotecas resultantes se las nombró como genoteca α y β respectivamente y, a los plásmidos pSLBam9 recombinantes, pRIV.

Se realizó una minipreparación de pRIV de las genotecas α y β y se amplificó con el par de *primers* FtnpRIVET/RtnpRIVET para verificar la presencia de insertos del rango de tamaños esperados. Se tomaron además 3 clones al azar, se purificaron los plásmidos y se enviaron a secuenciar, para confirmar las secuencias de los insertos presentaban similitud con *R. solanacearum* UY031.

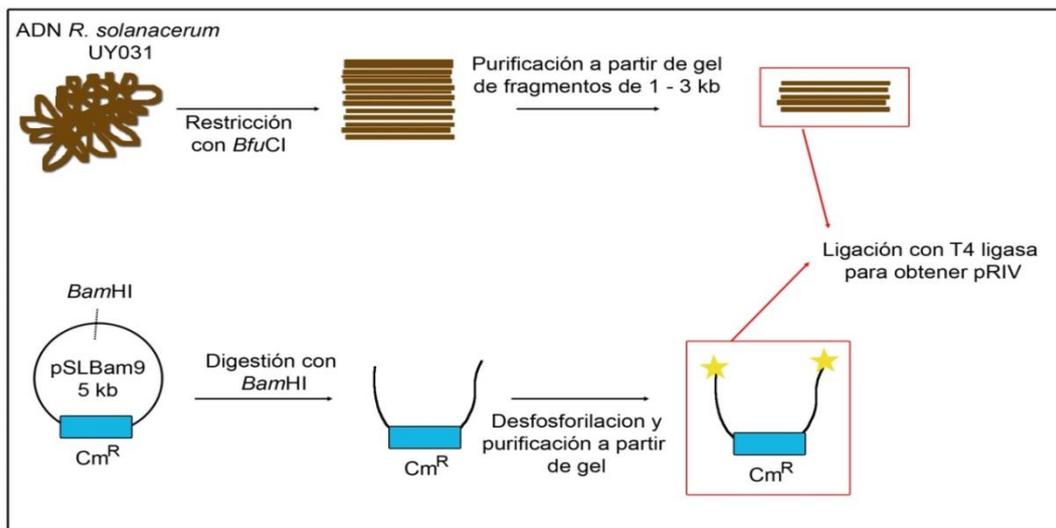


Figura 3.3. Esquema de construcción de la genoteca de *R. solanacearum* empleando el plásmido pSLBam9. Brevemente, el ADN genómico de *R. solanacearum* se digirió con *Bfu*CI. Los fragmentos mayoritarios, entre 1-3 kb se purificaron y se ligaron en el sitio único *Bam*HI de pSLBam9. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* S17 λ pir. Dado que la ligación se realizó por duplicado, se obtuvieron dos genotecas de 4000 clones cada una, a las que se les llamó α y β . Los plásmidos resultantes se citan como pRIV en el resto del texto.

3.2.5. Introducción de pRIV y los plásmidos control en *R. solanacearum* UY031_res.

Conjugación.

Se ensayaron 5 variantes de protocolos de conjugación, que se identificaron según el investigador que nos cedió el protocolo. La conjugación se realizó entre *E. coli* S17 λ pir, que posee la biblioteca genómica de *R. solanacearum* y la cepa reportera. Aunque *E. coli* S17 λ pir posee los genes *tra*, se evaluaron los protocolos sin cepa *helper* e incluyendo en la conjugación a *E. coli* HB101 (pRK2073), como cepa *helper*. Esto se realizó debido a que en un primer intento no se obtuvieron clones transconjugantes. El medio empleado para el crecimiento ON de las cepas de *E. coli* fue caldo LB (suplementado con Cm o Sm, según el caso) y para el crecimiento de *R. solanacearum*, caldo BG, para todos los protocolos descritos a continuación.

Protocolo de Kameka Walcott: Se preparó un cultivo líquido ON de las tres cepas. El *pellet* obtenido a partir de 1 mL de cultivo, se lavó y se resuspendió en 1 mL de suero fisiológico. Se mezclaron 900 μ L de cada una de las 3 cepas y se depositaron 100 μ L en Agar Nutriente en el centro de la placa. Se incubó por 48 h a 28°C. Se resuspendió la mezcla en 1 mL de caldo BG completo y se sembraron con rastrillo 100 μ L en agar BG completo suplementado con Cm.

Protocolo de Burdman: Se preparó un precultivo ON de las tres cepas. Al día siguiente, se transfirió una alícuota del precultivo a caldo fresco y se incubaron hasta que los cultivos alcanzaron a una $DO_{600} = 0,4 - 0,6$. A partir de cada una, se recuperó el *pellet* de 1 mL de caldo, se lavó y se resuspendió en 1 mL de suero fisiológico. Se transfirió 1 mL de la suspensión de *R. solanacearum* junto con 300 μ L de cada cepa de *E. coli* a un tubo, mezclando con suavidad. Nuevamente se recuperó el *pellet*, se resuspendió en 60 μ L de caldo nutriente y se sembró en el centro de una placa en Agar Nutriente. Se incubó por 48 h

a 28°C. Se recuperaron las células de la placa en 300 µL de caldo nutriente, se hicieron 3 diluciones seriadas 1/10 y se plaquearon todas las diluciones en agar BG completo suplementado con Cm y Amp para inhibir el crecimiento de *E. coli*.

Protocolo de Allen: Se preparó un cultivo ON de las tres cepas. Se cosechó el *pellet*, se lavó y se resuspendió en 1 mL de medio mínimo MP. Se ajustó la $DO_{600} = 0,5$ de todas las cepas. Se mezclaron en una proporción 1:1:1 (500 µL) y se cosechó el *pellet*, que se resuspendió en 200 µL de suero fisiológico y se colocó en el medio de una placa de agar medio mínimo MP. Se incubó por 4 – 6 hs a 28°C. Se lavó la placa y plaqueó en agar BG completo, suplementado con Cm y Amp, para seleccionar *R. solanacearum* transconjugantes.

Protocolo de Schell: Se incubaron todas las cepas en placas con medio con agar con los antibióticos correspondientes. Se recuperaron las células de cada placa y se resuspendieron en caldo BG completo hasta obtener una $DO_{600} = 0,05 - 0,1$. Se incubaron las cepas a 30°C por 4-5 hs. Se recuperó el *pellet* de cada cepa y se resuspendió en 500 µL de suero fisiológico. Se mezclaron en una proporción 1:1:1 (500 µL c/u) y se centrifugó para obtener el *pellet* de la mezcla, que suspendido en un pequeño volumen de suero fisiológico, se colocó en el medio de una placa de agar BG completo. Se incubó por 24 – 36 hs a 28°C. Se lavó la placa y sembró en agar BG completo, suplementado con Cm y Amp, para seleccionar *R. solanacearum* transconjugantes.

Protocolo de Brown: Se preparó un cultivo ON de las tres cepas en caldo LB (*E. coli*) o BG completo (*R. solanacearum*) suplementado con los antibióticos correspondientes. Se recuperó el *pellet* a partir de 1 mL de cada una de las cepas en el mismo tubo, de la siguiente forma: primero se le hizo un spin a cada una de las cepas de *E. coli*, removiendo todo el sobrenadante y luego se le hizo el spin a *R. solanacearum*. Se resuspendió el *pellet* de las tres cepas en un pequeño volumen de caldo BG completo y se colocó en el medio de una

placa de agar BG completo. Se incubó ON a a 28°C. Se lavó la placa la suspensión de células y sembró con rastrillo en agar SMSA modificado, suplementado con Cm, para seleccionar *R. solanacearum* transconjugantes.

Electroporación.

Adicionalmente se aplicó la técnica de electroporación de la cepa reportera para introducir los plásmidos pRIVPhrpG, pRIVPhrpB, pRIVPhrpG^{rev}, pRIVPhrpB^{rev} y la genoteca pRIV. Para preparar las células de *R. solanacearum* UY031_res electrocompetentes, se realizó el siguiente procedimiento: 4 mL de caldo BG completo suplementado con Km e inoculado con células de *R. solanacearum* se cultivaron ON a 28°C hasta $DO_{600} = 0,8 -1$. Se obtuvo el *pellet* centrifugando a 12 mil rpm y 4°C. Se resuspendió el *pellet* en 2 mL de agua calidad MQ fría y estéril y, se repitió la centrifugación en iguales condiciones. Se resuspendió nuevamente el *pellet* en 1 mL de agua calidad MQ fría y estéril. Se recuperó otra vez el *pellet*, pero esta vez se resuspendió en 500 µL de glicerol 10% frío y luego de la última centrifugación, el *pellet* se resuspendió en 45 µL de glicerol 10% frío y estéril. Las células se guardaron a -80°C.

Para la transformación, se resuspendió el plásmido precipitado con ARNt en 2 µL de agua estéril y se mezcló con la suspensión células electrocompetentes frías. Se transformó con un pulso eléctrico de 2,5 kV. Luego, se agregó 1 mL de caldo BG completo y se incubó a 30°C con agitación de 3 a 5 horas. Finalmente se plaquearon 100 µL y el resto de la mezcla de transformación en agar BG completo, suplementado con Cm. Como control de transformación, se empleó el plásmido pLAFR6.

3.2.6. Ensayo para verificar la actividad β -glucuronidasa en las cepas de *R. solanacearum*

UY031_res - control.

Se aislaron los clones transconjugantes en agar BG o medio mínimo a 28°C hasta observar crecimiento y se transfirieron a un papel Whatman con un tip. Se introdujo el papel Whatman en una placa de Petri vacía y se realizó un tratamiento con 2 mL de una solución de lisozima (10 mg/mL) a 37°C por 25 minutos, con agitación. Pasados los 25 minutos, se retiró la solución de lisozima y se cubrió el papel Whatman con el buffer de reacción (9,5 mL de buffer fosfato, 5 mL de $K_3Fe(CN)_6$ 0,5 mM, 5 mL de $K_4Fe(CN)_6$ 0,5 mM y 10 mg de X-gluc disuelto en 0,5 mL de DMSO). Se incubó ON a 37°C. Se empleó *E. coli* Top Ten como control positivo y *R. solanacearum* UY031 como control negativo.

3.3. Resultados.

3.3.1. Construcción y verificación de vectores control con promotores de los genes *hrpB* y *hrpG* para ser utilizados en la estrategia RIVET.

La construcción de los plásmidos control se realizó de acuerdo a la estrategia planteada en la Figura 3.2. En primer lugar, se diseñaron *primers* para amplificar los promotores de los genes *hrpG* y *hrpB* a partir del ADN genómico de la cepa WT. En el extremo de los *primers* se incluyeron los sitios de reconocimiento *Bam*HI. Debido a que la temperatura de *melting* de los dos pares de *primers* es similar, se optimizó la reacción de amplificación para ambos en simultáneo. Se realizó una PCR en gradiente, con temperaturas de *annealing* entre 60-70°C. Se obtuvo el fragmento esperado, de unos 500 pb para todas las temperaturas ensayadas (60; 60,7; 62,8; 65,5; 68,1 y 70°C; Figura 3.4).

El producto de amplificación correspondiente a cada promotor se purificó a partir de una electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos purificados se ligaron a los vectores correspondientes: PhrpG al vector pZT57R/T y PhrpB al vector pGemT-Easy. A partir de cada mezcla de ligación, se realizó la transformación por electroporación en *E. coli* TopTen, se sembró en LB suplementado con Amp y X-gal y, luego de la incubación se recuperaron aproximadamente 15 clones transformantes para cada ligación. Se extrajeron los plásmidos y se verificó la presencia del inserto mediante los *primers* universales SP6/T7 presentes en los vectores. Se digirieron los plásmidos con la enzima de restricción *Sca*I, que corta una única vez al vector de clonado y no corta al inserto. Se obtuvieron los plásmidos lineales del tamaño esperado (3,5 kb, Figura 3.4). Se envió a secuenciar un clon transformante para cada

promotor y se confirmó que la secuencia era la esperada y, que el sitio *Bam*HI flanqueando a cada lado el inserto se introdujo correctamente. A estos vectores plásmidos se les denominó pPhrpG y pPhrpB.

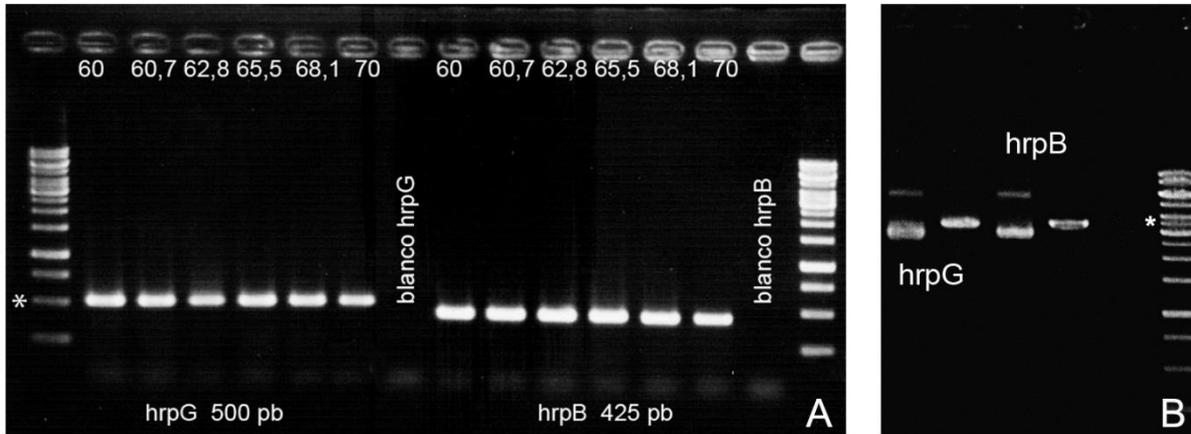


Figura 3.4. Construcción de los plásmidos control pPhrpG y pPhrpB. En A: Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de la PCR en gradiente para los pares de *primers* PhrpGF/PhrpGR y PhrpBF/PhrpBR. Se indica el control negativo para ambas amplificaciones. En la parte superior, se marca la temperatura de *annealing* empleada, en °C. El asterisco señala la banda en el marcador correspondiente al peso molecular de 500 pb (1 kb Gold Biotechnology, USA). En B: Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa 1 % de la digestión de los plásmidos pPhrpG y pPhrpB con la enzima *Sca*I. En los carriles 1 y 2 se observa el plásmido pPhrpG circular y digerido respectivamente. En forma análoga, los carriles 3 y 4 corresponden al plásmido pPhrpB. El asterisco indica la banda de 3,5 kb en el marcador de peso molecular (1 kb Gold Biotechnology, USA).

En una segunda etapa, se digirieron tanto pPhrpG como pPhrpB empleando la enzima de restricción *Bam*HI. Como resultado, se obtuvieron 2 bandas en cada caso: una de 500 pb aprox. (el promotor) y otra de 3 kb (el vector de clonado). La banda de menor tamaño se purificó a partir del gel de agarosa de una corrida electroforética y se ligó al vector pSLBam9, previamente digerido con la misma enzima de restricción, desfosforilado y purificado. La mezcla de ligación se introdujo por electroporación a *E. coli* S17λpir. Se aislaron unos 12 clones a partir de la transformación con cada uno de los promotores y se extrajeron sus plásmidos.

Sobre cada uno de éstos se realizó una reacción de PCR con el par de *primers* FtnpRIVET/RtnpRIVET, para verificar la presencia de los insertos del tamaño esperado (aprox. 800 pb). Luego, sobre los plásmidos recombinantes seleccionados se realizaron las reacciones de PCR con el par de *primers* PhrpGF/RtnpRIVET o PhrpGF/RtnpRIVET, según correspondiera. Si el promotor se hubiera insertado en el sitio *Bam*HI de pSLBam9 en la orientación correcta en el sentido *tnpR-uidA*, el producto de amplificación debería ser de unos 600 pb. Si la orientación fuera la inversa, el producto de amplificación sería de 100 pb.

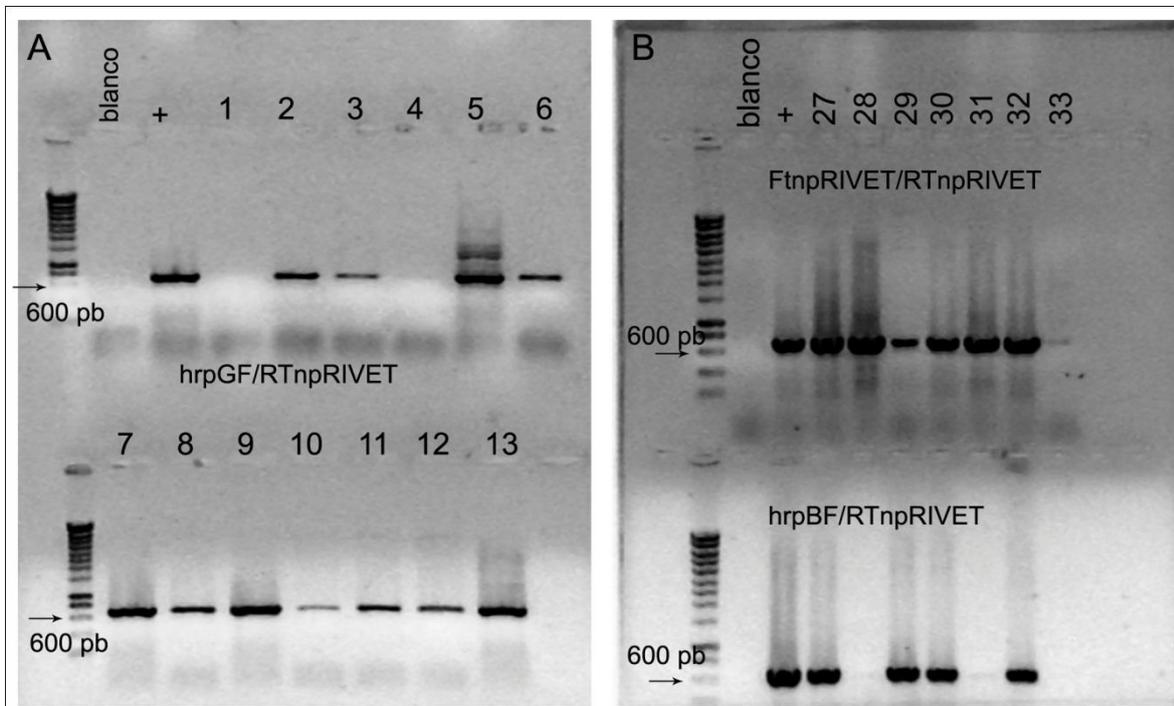


Figura 3.5. Verificación por PCR de la construcción de pRIVPhrpG y pRIVPhrpB. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1%. El marcador de peso molecular es Smart Ladder 1 kb (Eurogentec). En A: Reacción de PCR a partir de 13 clones transformantes para el promotor de *hrpG*, empleando el par de *primers* hrpG/RTnpRIVET. Los clones 1 y 4 son candidatos a tener el inserto en orientación invertida. En B: Reacción de PCR a partir de 7 clones transformantes para el promotor *hrpB*. En la parte superior se amplificó con el par de *primers* FtnpRIVET/RTnpRIVET que verifica la presencia del inserto. En la parte inferior, el uso del par hrpBF/RTnpRIVET da la pauta que el clon 28 y el 31 podrían tener el promotor en orientación invertida.

El tamizaje sobre los plásmidos evidenció la presencia de clones transformantes con insertos en cada uno de los sentidos (Figura 3.5). Se seleccionó un clon con el inserto en cada una de

las orientaciones y se envió a secuenciar. El análisis de la secuencia corroboró la identidad correcta de los insertos. A los plásmidos se los nombró pRIVPhrpG, pRIVPhrpB, pRIVPhrpG^{rev}, pRIVPhrpB^{rev} y las cepas que los contienen deberían hacer posible la verificación del sistema RIVET.

3.3.2. Introducción de los vectores control en la cepa reportera UY031_res.

Se aplicaron los 5 protocolos de conjugación descritos en Materiales y Métodos (inciso 3.2.5) por duplicado para cada uno de los plásmidos control. Solamente se obtuvieron 3 clones transconjugantes para el promotor hrpG^{rev}. Se intentó introducir los plásmidos control por transformación natural, pero tampoco se obtuvieron resultados favorables.

Finalmente, se electroporaron los plásmidos control en células UY031_res electrocompetentes. La eficiencia de transformación, calculada a partir de la transformación de pLAFR6 fue de 10^2 ufc/ μ g de ADN. El resultado, muy por debajo de lo usual, es razonable teniendo en cuenta que pLAFR6 es un cósmido de 22 kb de tamaño. Además, indica que la cepa reportera es transformable.

Mediante este protocolo, que se repitió dos veces para cada promotor, se obtuvieron 7 clones transformantes para PhrpG, el mismo número de clones transformantes para PhrpG^{REV}, y dos clones para PhrpB. Además de la inspección visual, la identidad de los clones se verificó por PCR, a partir de un clon aislado, con los *primers* 759/760, específicos para *R. solanacearum*.

3.3.3. Ensayo cualitativo de β -glucuronidasa: verificación del funcionamiento *in vitro* de la expresión de *tnpR-uidA* en la cepa reportera transformada con los promotores control.

Los 19 clones recuperados en el punto 3.3.2 se cultivaron en medio BG completo (medio nutriente) y medio mínimo, suplementados ambos con Cm y se transfirieron a un papel Whatman, sobre el cual se realizó el ensayo enzimático de la β -glucuronidasa. Los controles del ensayo, una cepa de *E. coli* y la cepa de *R. solanacearum* UY031 dieron un resultado según lo esperado, no así los clones recuperados. Se observa que en medio nutriente, la mayoría de los clones expresaron β -glucuronidasa (Figura 3.6). Se esperaba que solo los clones con PhrpG clonado *upstream* a *tnpR-uidA* indujeran la expresión en estas condiciones. Por otra parte, las condiciones de medio mínimo, que emulan el apoplasto de la planta, deberían inducir fuertemente a la fusión transcripcional controlada por los promotores PhrpG y PhrpB. Sin embargo, en medio mínimo no se observó expresión para la mayoría de los clones.

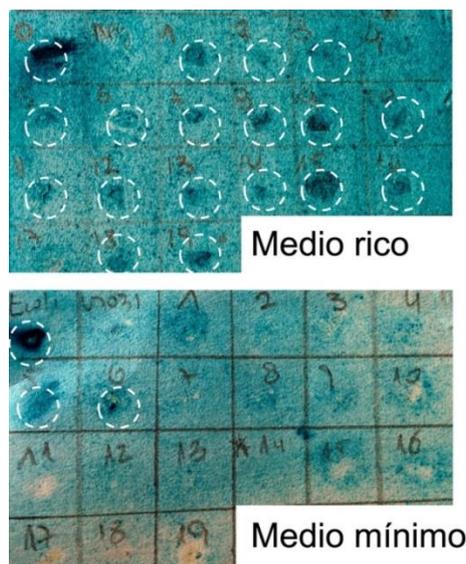


Figura 3.6. Ensayo cualitativo de β -glucuronidasa. En la parte superior se indican los resultados de los 19 clones en condiciones de medio nutriente y en la de abajo, en medio mínimo. Para cada imagen, los dos primeros recuadros son los controles positivo (*E. coli*) y negativo (*R. solanacearum* WT). El círculo punteado blanco marca la expresión de β - glucuronidasa.

Dado que estos resultados desalentadores debían ser confirmados, se realizó la extracción de ADN de los 19 clones y se verificó de la cointegración de pRIVPhrpG, pRIVPhrpB, pRIVPhrpG^{rev} por PCR. En la Figura 3.7 se muestra el resultado esperado de la cointegración y la ubicación de los *primers* empleados. Se empleó el par de *primers* tnpF/RtnpRIVET para amplificar una porción de aprox. 300 pb de *tnpR* y los pares hrpBUF/hrpBDR y hrpGUF/hrpGDR para amplificar el plásmido control co-integrado. En el caso de los dos últimos pares de *primers*, se esperaba un amplicón de 1057 y 1845 pb respectivamente, cuando se emplea como molde el ADN de la cepa WT. Cuando las reacciones de PCR son realizadas sobre los clones con las cointegraciones de pRIVPhrpB o pRIVPhrpG, se espera un producto de 6,5 y 7,5 kb respectivamente.

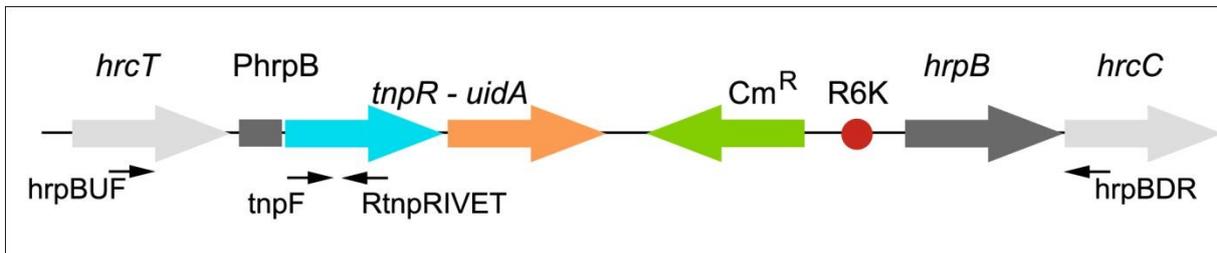


Figura 3.7. Esquema de la integración de pRIVPhrpB en el genoma de la cepa reportera. El promotor PhrpB queda duplicado. Se señala con flechas negras la ubicación aproximada de los *primers* empleados en la verificación de los clones transconjugantes (zona inferior). Para pRIVPhrpG se emplean primer análogos: hrpGUF se ubica sobre el gen *hpaB* y hrpGDR sobre *phjJ*.

Las reacciones de amplificación se optimizaron exitosamente sobre *R. solanacearum* UY031 y pSLBam9. Las amplificaciones realizadas sobre los 19 clones fueron negativas para todos los casos, sugiriendo que los plásmidos control no se cointegraron en la cepa reportera o que la integración no fue estable.

Dado que los 19 clones eran resistentes a Cm, el fenotipo observado podría explicarse por la presencia transitoria de los plásmidos control en la cepa reportera. Se repicaron los 19 clones en caldo BG suplementado con Cm durante 3 veces consecutivas, para verificar si el

vector suicida se estaba manteniendo transitoriamente en forma episomal (sugerencia del Dr. Leonardo de La Fuente, College of Agriculture, University of Auburn, comunicación personal). Para todos los clones se observó una pérdida de la resistencia al antibiótico en el segundo o tercer pasaje, lo que da la pauta de que los plásmidos no se integraron en la cepa reportera o que si lo hicieron, en ausencia del antibiótico, se perdió la integración.

3.3.4. Construcción de la biblioteca genómica de *R. solanacearum* UY031 en pSLBam9.

En primer lugar se realizó una maxi extracción del ADN genómico de *R. solanacearum* UY031. Se estimó semicuantitativamente la concentración de ADN en 100 ng/μL a partir de una electroforesis en gel de agarosa, comparado las intensidades de las bandas del ADN genómico con las de un marcador de peso molecular de concentración conocida.

A la hora de construir la biblioteca, fue de gran importancia optimizar la cantidad de enzima de restricción, la cantidad de ADN genómico y el tiempo de incubación de la digestión enzimática. Combinando estos factores, se buscó realizar una digestión parcial de forma tal que la mayor concentración de fragmentos se encontrara en el rango de tamaños 1-4 kb.

Inicialmente se mantuvo constante el tiempo de incubación, que se fijó en 15 minutos. Se digirieron 150 ng de ADN con concentraciones variables de la enzima *BfuCI*. Se partió de una concentración de 0,025 U/μL y se hicieron 4 diluciones seriadas al medio. Bajo estas condiciones, el mejor resultado se obtuvo cuando se empleó 0,00157 U/μL de la enzima. Sin embargo, el tamaño de los fragmentos más abundantes fue menor a lo deseado (800 – 1000 pb, Figura 3.8, condición A5). Trabajando con 0,00157 U/μL de enzima y 150 ng de ADN, se repitió la experiencia variando el tiempo de incubación en 5, 10, 12 y 15 minutos. Bajo estas condiciones los resultados tampoco fueron los deseados, pues los fragmentos más

abundantes exhibieron tamaños mayores a los buscados. La condición B4 (Figura 3.8) es similar a la A5 pero los resultados no fueron reproducibles.

En un tercer intento, se mantuvo fija la concentración de enzima en 0,00157 U, digiriendo 4,5 µg de ADN genómico durante 5 y 7 minutos. Bajo la condición de 7 minutos se obtuvo el resultado deseado; los fragmentos se purificaron a partir de banda de gel de agarosa usada para el ensayo de electroforesis y se usaron para la ligación.

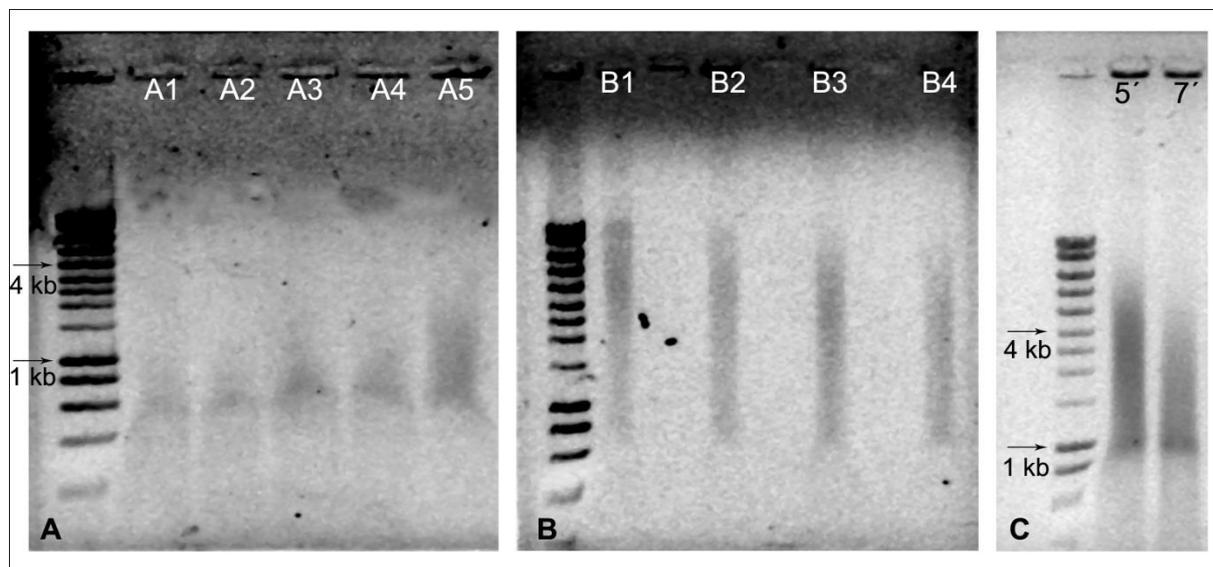


Figura 3.8: Optimización de la digestión parcial del ADN genómico de *R. solanacearum* UY031 con la enzima de restricción *BfuCI*. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa 0,8%. En A: Se mantiene fijo el tiempo de incubación y se varía la cantidad de enzima de restricción empleada. En B: Se fija la cantidad de enzima (0,00157 U/µL) y se varía el tiempo de incubación (5, 10, 12 y 15 min respectivamente). En C: Con la cantidad de enzima determinada en la experiencia A, se prueban tiempos intermedios empleando la cantidad de ADN necesaria para llevar a cabo las construcciones. La condición 7 minutos fue la elegida para realizar la genoteca.

En paralelo se digirió completamente el plásmido pSLBam9 con *BamHI*, se desfosforiló y se purificó mediante un kit. El plásmido linealizado se ligó en una relación 1:5 con los fragmentos del ADN genómico y se transformó por electroporación en *E. coli* S17 λpir. La transformación se hizo por duplicado. Se obtuvieron dos genotecas, α y β, de

aproximadamente 4000 clones cada una. Los plásmidos pSLBam9 conteniendo los insertos de ADN genómico se nombran, colectivamente, pRIV.

Para verificar la presencia de inserto en los clones transformantes, se realizaron dos experiencias: por un lado, se aislaron 3 clones al azar, se purificaron sus plásmidos y se los envió a secuenciar su plásmido con los *primers* FtnpRIVET/RTnpRIVET. Los tres presentaron un inserto de aproximadamente 1 kb, con una alta identidad de secuencia con *R. solanacearum* r3bv2 (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Resultado del Blast de los insertos secuenciados de 3 clones de pRIV.

Clon #	Tamaño inserto	% de identidad	Organismo	Característica de la secuencia
15	800 pb	99	<i>R. solanacearum</i> UW551	Desconocida
18	700 pb	99	<i>R. solanacearum</i> IPO1609	Etanol amina amoníaco lyasa
19	1200 pb	99	<i>R. solanacearum</i> IPO1609	Proteína transmembrana

Por otro lado, se cultivó cada genoteca en caldo BG completo suplementado con Cm y se hizo una extracción de plásmidos al total de los clones. Esta minipreparación se empleó de molde en una PCR con los *primers* FtnpRIVET/RTnpRIVET. Se obtuvo un *smear* de insertos de tamaño entre 400 pb y 1,5 kb. Los insertos de mayor tamaño podrían estar sub representados, debido a que el tiempo de extensión de la PCR fue de 1 minuto y que se empleó una *Taq* polimerasa estándar y no una *long Taq* polimerasa.

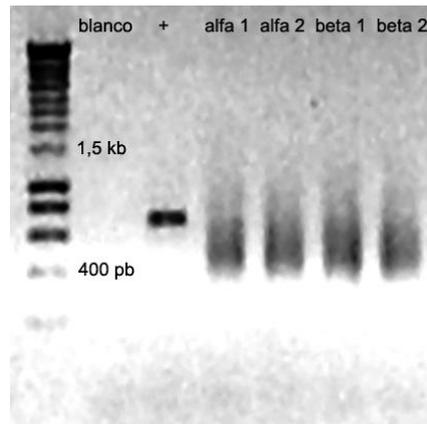


Figura 3.9. Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% de la amplificación con los *primers* tnpF-RtnpRIVET de las minipreps de las dos genotecas por duplicado. Se incluyó un blanco y un control positivo (pRIVPhrpG) que dieron lo esperado. Las genotecas tienen insertos entre 400-1500 pb.

El tamaño promedio de los insertos es de 0,8 kb. Según la ecuación de Clark-Carbon (1976), la genoteca representaría un 70% del genoma de la bacteria (suponiendo un inserto promedio de 0,8 kb y teniendo en cuenta que el tamaño del genoma es de 5,8 Mb).

3.3.5. Introducción de pRIV en la cepa reportera UY031_res.

Al igual que con los vectores control, se aplicaron los 5 protocolos de conjugación, el protocolo de transformación natural y el de electroporación, por triplicado. En paralelo, se realizó como verificación la conjugación de la cepa de *R. solanacearum* UY031 (WT) con los vectores control mediante todos los protocolos descritos. En ninguno de los casos se obtuvieron clones.

3.4. Discusión.

En la introducción de este Capítulo se estableció la necesidad de construir una biblioteca genómica clonada *upstream* a la fusión transcripcional *tnpR-uidA* sin promotor, para evaluar si los insertos genómicos de *R. solanacearum* UY031 tienen la capacidad de promover la expresión de TnpR y β -glucuronidasa bajo las condiciones de estudio, en la planta. Para evaluar que los dos módulos del sistema, el *cassette res* en la cepa reportera y la genoteca, logran establecer el diálogo molecular propuesto por la estrategia, el sistema debe contar con controles positivos y negativos. A partir de la bibliografía se escogieron los promotores de los genes *hrpG* y *hrpB*; ambos son reguladores de la expresión del TTSS, pero mientras HrpB sólo se expresa cuando es activado por señales de la planta, HrpG tiene un nivel de expresión basal constitutivo y dispara su expresión frente a la interacción de la bacteria con el hospedero (Genin *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1999). Esa expresión diferencial entre ambos genes puede ser aprovechada para evaluar el sistema. Como controles negativos se propuso el uso de estos mismos promotores, pero en orientación invertida con respecto a la unidad *tnpR-uidA*. Dado que la orientación del promotor frente al gen que se desea expresar es relevante, la inversión impide que se desarrolle la actividad del promotor.

Tanto la construcción de la genoteca en pSLBam9 (pRIV) como la introducción de los promotores en sentido correcto o invertido *upstream* a la fusión transcripcional *tnpR-uidA* se desarrollaron según lo planificado. Todas las construcciones fueron verificadas por PCR y por secuenciación, confirmando su identidad.

En la genoteca se obtuvieron unos 8000 clones, lo cual implica una cobertura de aproximadamente el 70% del genoma de *R. solanacearum*, que sería aceptable para llevar a cabo la estrategia.

A la hora de introducir las construcciones realizadas, que se mantenían en *E. coli* S17 λ pir, a la cepa reportera, no se obtuvieron los resultados esperados. Inicialmente se decidió realizar la transferencia por conjugación, ya que es una técnica que tiene una eficiencia muy alta. Sin embargo, luego de aplicar en forma reiterada 5 protocolos de conjugación, no se obtuvieron clones transconjugantes.

Frente a estas dificultades se planteó la hipótesis de que la cepa reportera podría no ser transformable, pese a que el evento de doble recombinación homóloga por el que se introdujo del *cassette res* está bien caracterizado y se conoce que la zona en la que se introdujo no afecta ningún aspecto del desempeño de la bacteria (Monteiro *et al.*, 2012 B). Para ello, se testeó la introducción de los plásmidos control por electroporación y se empleó al plásmido pLARF6 (Tc^R) como control de transformación: este vector ha sido ampliamente usado para realizar construcciones en *R. solanacearum* y se mantiene en forma extracromosomal (Deslandes *et al.*, 2003; Genin *et al.*, 2005; Tasset *et al.*, 2010 entre otros). Tampoco se obtuvieron clones transformantes para los promotores control por electroporación pero los resultados de este simple ensayo permitieron concluir que la cepa reportera es transformable, ya que se recuperaron varios clones transformantes Tc resistentes para pLARF6. Sin embargo, es importante destacar que un plásmido como pLARF6, que se mantiene en la bacteria, tiene una eficiencia de transformación más alta que un vector suicida, cuya integración es obligatoria.

Una segunda hipótesis es que el vector puede ingresar a la cepa reportera pero no es capaz de recombinar y co-integrarse, lo cual parecería estar ocurriendo a la luz de los resultados que se obtuvieron luego de realizar chequeos (PCR, ensayo de actividad de la β -glucuronidasa) de los pocos clones transconjugantes/transformantes que se obtuvieron para los plásmidos control, tal como se indicó en el inciso 3.3.2 de Resultados. Esto podría

deberse a que la zona de homología de los promotores es muy corta (500 pb). Habitualmente se realizan construcciones de unos 800 – 1000 pb para favorecer la recombinación en *R. solanacearum*, aunque existen trabajos que demuestran que 50 pb son suficientes para obtener clones transformantes (Bertolla *et al.*, 1997). Además, la genoteca cuenta con un número elevado de plásmidos con insertos de tamaño aprox. 800 pb, y tampoco se obtuvieron clones transconjugantes en ese contexto. Otra posibilidad, que también fue explorada, es que la construcción de la cepa reportera habría afectado al sistema de recombinación de la bacteria. Los intentos frustrados de realizar una conjugación tripartita entre las cepas de *E. coli* S17 λ pir que contienen las construcciones control con la cepa WT de *R. solanacearum* no avalan esa hipótesis.

Hasta la fecha no se pudo dilucidar cuál es la razón por la que no fue posible introducir las construcciones realizadas en pSLBam9 en *R. solanacearum* UY031.

Estos resultados desfavorables, junto con la publicación simultánea de un artículo que propone una estrategia alternativa de RIVET, que permite el aprovechamiento de la cepa reportera ya construida (Lozano *et al.*, 2013), impulsaron un cambio en la estrategia, que es desarrollado en el Capítulo 4.

Construcción de una colección de clones transconjugantes de *R. solanacearum* mediante el uso de un minitrasposón con *tnpR-lacZ*.

Resumen

En este Capítulo se presenta el uso de una estrategia alternativa para cumplir los objetivos planteados en la tesis. Debido a las dificultades enfrentadas durante la introducción de la genoteca de *R. solanacearum* UY031 en la cepa reportera, se optó por desarrollar una librería de transconjugantes, empleando un miniTn5 con la fusión *tnpR-lacZ* sin promotor. Mediante la acción de una transposasa, se inserta *tnpR-lacZ* al azar en el genoma de la cepa reportera. Si existe un promotor adyacente que se induce por señales de la planta, dirige la expresión de *tnpR* y de *lacZ*, escindiendo el *cassette res* y dando lugar a colonias azules en un medio suplementado con X-gal.

Los resultados obtenidos indican que esta variante de la estrategia RIVET funciona adecuadamente en el patosistema *R. solanacearum* – papa y que tanto el *cassette res* como la fusión transcripcional se mantienen estables luego de que el *pool* de bacterias se inocula en la planta. Se recuperaron 17 clones que se resolvieron en la planta, que deberán ser caracterizados para generar una lista de los promotores que han sido inducidos *in vivo*.

4.1 Introducción.

A principios del año 2013 se publicó una variante de la estrategia RIVET en la que se sustituye la construcción de la genoteca de *R. solanacearum* en pSLBam9 y su posterior introducción a la cepa reportera por el uso de una herramienta molecular basada en un miniTn5 (Lozano *et al.*, 2013).

El plásmido pSLBam9 es un vector suicida en *R. solanacearum* y movilizable. Tiene un origen de replicación R6K, con un rango de hospedero estrecho y de bajo número de copias en los hospederos dónde se replica. Estas características hacen que en la práctica sea difícil trabajar con él: el rendimiento de las mini/maxi preparaciones plasmídicas y la eficiencia de transformación en cepas de *E. coli* λ pir son bajos. Estos inconvenientes, que dificultaron el proceso de construcción de la genoteca descrito en el Capítulo 3, se vieron agravados por la imposibilidad de integrar la genoteca en forma estable en la cepa reportera, en las condiciones evaluadas.

Recientemente, fue publicada una herramienta genética útil para realizar construcciones basadas en un miniTn5 (Martinez-García *et al.*, 2011): el plásmido pBAM1.

El vector pBAM1 (*born – again – minitrasposon*) es un plásmido de diseño en el que los genes que lo conforman fueron optimizados por métodos bioinformáticos para minimizar su tamaño, mejorar su funcionalidad y para permitir manejar los genes como módulos intercambiables (Figura 4.1).

El origen de replicación, al igual que en pSLBam9 es el *oriV* de R6K; la transferencia se da por el origen *oriT* del plásmido de amplio rango de hospedero RK2. Posee también el gen *bla*, de resistencia a ampicilina y el gen que codifica para la transposasa (*tnpA*), que se encuentra adyacente a un segmento de ADN flanqueado por dos secuencias de Tn5, a las que se le llama regiones mosaico (ME - I/ME - 0) idénticas entre sí. Este segmento de ADN es el segmento *cargo*, entre las secuencias mosaico hay una región con múltiples sitios de

restricción que permite clonar la construcción de interés. La transposasa Tn5 (*tnpA*) reconoce las regiones mosaico y cataliza la transferencia del segmento cargo hacia el genoma de interés, en el que se inserta aleatoriamente como un minitrasposón, otorgando resistencia a Km.

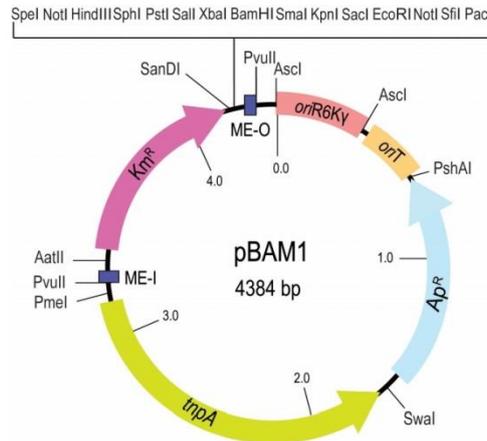


Figura 4.1. Mapa del plásmido pBAM1. Los elementos funcionales del plásmido incluyen los sitios de restricción relevantes, los genes de resistencia (Ap, Km), la transposasa (*tnpA*), el origen de replicación (R6K), el origen de transferencia (*oriT*) y los elementos mosaico (ME). Tomado de Martínez *et al.* (2011)

El grupo del Dr. Antonio Lagares, del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular en La Plata (Argentina) adaptó pBAM1 a la estrategia RIVET: en la región cargo, entre ME - 1 y ME - 0 se clonó el gen que codifica para la resolvasa (*tnpR*) fusionada a *lacZ*, ambos sin promotor y con el gen marcador Tc^R (comunicación personal, no publicado, Figura 4.2 A). A este vector se le llamó pMES4. Dado que la *tnpR* clonada en pMES4 es igual a la empleada en pSLBam9, se puede sustituir fácilmente la genoteca que se mantiene en pRIV (Capítulo 3) por una biblioteca de transconjugantes con el miniTn5. La idea global es que el segmento *cargo* se transpone al azar en el genoma de la cepa reportera; si se induce un promotor adyacente al miniTn5 (*upstream* a la fusión *tnpR-lacZ*), éste dirige la expresión de la resolvasa y del gen *lacZ* que codifica para la β - galactosidasa, escindiendo el *cassette res* y dando lugar a la

formación de colonias azules cuando la cepa crece en placas con medio de cultivo con X-gal (Figura 4.2 B).

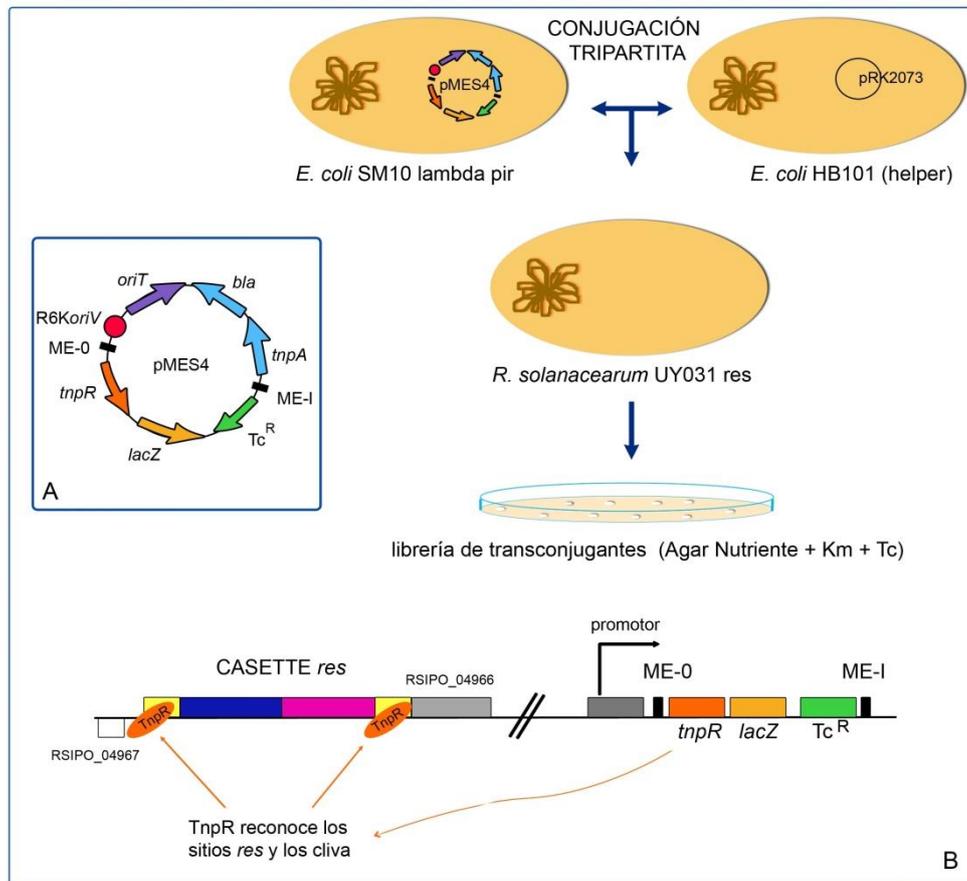


Figura 4.2. Construcción alternativa de la biblioteca pRIV para desarrollar la estrategia RIVET: librería de transconjugantes. En A, mapa genético del vector pMES4, cedido por el Dr. Lagares; en B, pasos para la construcción de la librería de transconjugantes: mediante una conjugación tripartita se introduce aleatoriamente el segmento *cargo* contenido entre las regiones mosaico (ME-0 y ME-I). Se seleccionan las colonias blancas en Agar Nutriente suplementado con Km, Tc y X-Gal, que son los clones que no se resuelven espontáneamente por la expresión de promotores constitutivos. Estos clones se inoculan en la planta; si un promotor se induce, *tnpR-lacZ* se expresa provocando un cambio en el fenotipo de la cepa reportera (pasa a ser Km^S y azul, en un medio suplementado con X-Gal).

En este Capítulo se presenta la construcción de una biblioteca de transconjugantes de *R. solanacearum* (cepa reportera) con pMES4 y la verificación de la funcionalidad del sistema *in vitro* y en la planta.

4.2. Materiales y métodos.

4.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios.

Las cepas bacterianas y los plásmidos usados se enumeran en la Tabla 4.1. Las cepas de *Ralstonia solanacearum* se aislaron en medio BG completo suplementado con cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (TZC) 0,05% y 1,8% de agar (Boucher *et al.*, 1985). Se incubaron a 28°C por 48 h. Para la extracción de ADN genómico, las cepas se inocularon en caldo BG sin glucosa (BG base) y se incubaron ON a 28°C con agitación (150 rpm). Las cepas de *Escherichia coli* empleadas se incubaron en medio Luria-Bertani (LB, Sambrook y Rusell, 2001) a 37°C. Se agregaron antibióticos cuando fue necesario, en las siguientes concentraciones: Ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Kanamicina (Km) 50 µg/mL, Espectinomicina 100 µg/mL (Sp) y Tetraciclina (Tc) 10 µg/mL. Los transconjugantes se seleccionaron en el medio SMSAm (Elphinstone *et al.*, 1996, ver Anexo I).

Tabla 4.1: Resumen de plásmidos y cepas empleados en la construcción de la biblioteca de transconjugantes

Cepa		
Nombre	Características	Referencia
<i>R. solanacearum</i> UY031	wild type raza3 biovar 2	Siri <i>et al.</i> , 2011
<i>R. solanacearum</i> UY031_res	UY031 res cassette Km ^R Suc ^S Amp ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> SM10 λpir	Km ^R , thi-1, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu, pir	Osorio <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i> HB101	pro, leu, thi, lacY, Sm ^R , endoI, recA ⁻ , hsrA ⁻ , hsm ⁻	Boyer y Roulland – Dussoix 1969
Plásmidos		
Nombre	Características	Referencia
pMES1	miniTn5-tnpR-lacZ, Km ^R , derivado de pBAM1	Lozano <i>et al.</i> , 2013
pMES4	miniTn5-tnpR-lacZ, Tc ^R , derivado de pBAM1	Lagares, com. per.
pRK2073	Sp ^R , mob ⁻ , tra ⁺	Figurski y Helinski, 1979

4.2.2. Diseño de *primers*, optimización de las reacciones de amplificación y análisis de las secuencias.

El diseño de *primers* y la optimización de las reacciones de amplificación se llevó a cabo tal como se describió en el ítem 2.2.2 del Capítulo 2 de esta tesis. La lista de *primers* se presenta en la Tabla 4.2. La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en Macrogen (Korea). De la misma manera, para el análisis de las secuencias, se procedió tal como indica el ítem 2.2.3.

Tabla 4.2: *Primers* usados en el Capítulo 3: se subrayan los sitios de restricción agregados

<i>Primers</i>		
Nombre	Secuencia	Referencia
checkTn5F	CAGCAGCAGACCATTTTCAA	Este estudio
checkTn5R	GGTATCAACCAGCCAGCAAT	Este estudio
resFEco81I	TTGC <u>cctgagg</u> ACTACTTAGGGCGAATTGG	Este estudio (cap. 2)
resREco81I	TTGC <u>cctgagg</u> CACTAAAGGGAACAAAAGCTGG	Este estudio (cap. 2)
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	Opina <i>et al.</i> , 1997
760	GTCGCCGTCAAGCAATGCGGAATCG	Opina <i>et al.</i> , 1997
UDF	CTACAACGAGTGGCTGAAGG	Este estudio (cap. 2)
F1resR	CAAGACGTTTCCCGTTGAAT	Este estudio (cap. 2)

4.2.3. Construcción de una biblioteca de transconjugantes de *R. solanacearum* UY031_res con el miniTn5 pMES4.

Optimización de la conjugación: Se puso a punto el protocolo de conjugación con la cepa WT UY031 y el vector pMES1, que es Km^R y cuyo uso fue publicado. Se probaron los protocolos suministrados por C. Allen y D. Brown (Universidad de Winsconsin, comunicación personal)

para *R. solanacearum*, con algunas modificaciones tomadas de Martínez-García *et al.* (2011) y de Lorenzo *et al.* (2012).

Protocolo de Allen: Se preparó un cultivo ON de *E. coli* HB101 (pRK2073) a 37°C en caldo LB suplementado con Sp; de *E. coli* SM10 λ pir (pMES1) a 37°C en caldo LB suplementado con Km y de *R. solanacearum* UY031 a 28°C en caldo BG completo. Se recuperó el *pellet* a partir de 1,5 mL de cultivo, se lavó y se resuspendió en 1 mL de MgSO₄ 10mM. Se ajustó la DO₆₀₀= 0,5 para todas las cepas. Se mezclaron en una proporción 1:1:1 (200 μ L) y se recuperó el *pellet* en 100 μ L de MgSO₄ 10 mM, que se colocó en el centro de una placa de agar medio mínimo. Se incubó por 4 - 6 hs a 30°C. Se agregó 1 mL de caldo BG a la placa, se resuspendieron las células y sembró en superficie en agar SMSAm, suplementado con Km, para seleccionar *R. solanacearum* transconjugantes. Como control negativo, se sembraron 200 μ L de cada cepa en agar SMSAm, suplementado con Km y como control de medio, 200 μ L de *R. solanacearum* UY031 en agar SMSAm.

Protocolo de Brown: Se preparó un cultivo ON de las tres cepas, de la misma forma que en el protocolo de Allen. Se obtuvo el *pellet* de 1,5 mL de cada una de las cepas en el mismo tubo, de la siguiente forma: primero recuperó el *pellet* de las *E. coli*, removiendo todo el sobrenadante y luego se hizo realizó lo mismo para *R. solanacaerum*. Se resuspendió el *pellet* de las tres cepas en 500 μ L de MgSO₄ 10mM y se colocó en el centro de una placa de agar BG completo. Se incubó ON. Se lavó la placa y sembró en superficie en agar SMSAm, suplementado con Km, para seleccionar *R. solanacearum* transconjugantes.

Conjugación de la cepa reportera con pMES4: Se realizaron 4 conjugaciones entre la cepa reportera y *E. coli* SM10 λ pir portando pMES4 y empleando a *E. coli* HB101 (con pRK2073) como cepa *helper*, siguiendo el protocolo de Brown. En la primera conjugación, se seleccionó en SMSAm suplementado con Tc para obtener un *pool* de transconjugantes, resueltos o no.

El objetivo de esta conjugación fue caracterizar clones resueltos *in vitro*. Las siguientes tres conjugaciones se seleccionaron en SMSAm suplementado con Tc y Km, para obtener clones no resueltos *in vitro*, para inocular plantines de papa.

4.2.4. Ensayo en planta.

Se obtuvieron plantines de *S. tuberosum* cv. Chieftain por micropropagación *in vitro* a partir de un entrenudo de la planta madre en medio Murashige y Skoog agar (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa 30 g/L. Los plantines se mantuvieron tres semanas a 22°C con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Luego se transfirieron a germinadoras con pocillos de 17 cm³ conteniendo suelo comercial (Tref, Moerdijk, Holanda) y se aclimataron en invernadero a 22-25°C bajo luz natural previo a la inoculación, durante 4 semanas. Para los ensayos, se inoculó con 5 µL de una suspensión bacteriana de DO₆₀₀ aprox 0,1 en el segundo nudo del plantín, luego del ápice. Para ello, se hizo una microherida con aguja y se depositó con tip 5 µL del inóculo. Se definió como unidad experimental a 2 plantines. Se incluyó como control negativo un blanco de agua. Las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28°C con un fotoperíodo de 16 horas hasta la aparición de síntomas (unos 6 días).

Luego de la aparición de síntomas, se cortó 100 mg de tallo próximo a la zona de inoculación, se quitaron las hojas, se desinfectó con alcohol 70% por 1 minuto, se lavó con agua destilada durante 1 minuto y se secó con papel estéril. Se colocaron los dos tallos de la unidad experimental en un tubo de 1,5 mL con 1 mL de agua estéril y se maceraron. Se realizaron diluciones seriadas hasta extinción y se plaquearon en Agar Nutriente con Tc. Los clones que crecieron en placas contables se traspasaron a Agar nutriente con Km.

Se realizaron tres ensayos en planta, siguiendo este procedimiento. En el primer ensayo, se inoculó un único clon no resuelto *in vitro*. En el segundo ensayo, se preparó el inóculo con

seis clones no resueltos *in vitro*. En el tercer ensayo se empleó un *pool* de 5000 clones obtenidos de una de las librerías de transconjugantes.

4.3. Resultados.

4.3.1. Optimización del protocolo de conjugación y verificación del funcionamiento del sistema *in vitro*.

Como primera aproximación al uso del miniTn5 en el estudio de la interacción papa – *R. solanacearum*, se evaluaron dos protocolos de conjugación con la cepa WT y *E. coli* SM10 λ pir (pMES1). Se introdujeron algunos cambios con respecto a los protocolos empleados en el Capítulo 3; el principal fue que se empleó el medio selectivo para *R. solanacearum* SMSAm suplementado con los antibióticos necesarios en lugar de agar BG completo. En estas condiciones, tanto el protocolo de Allen como el de Brown permitieron obtener clones transconjugantes. En las condiciones del protocolo de Brown se obtuvo un orden mayor de clones que en el de Allen. Por este motivo, se decidió continuar trabajando con este protocolo, que además es más sencillo en cuanto a las manipulaciones.

En base a estos resultados, se realizó la conjugación de *R. solanacearum* UY031_res con *E. coli* SM10 λ pir portando pMES4. Este plásmido es similar a pMES1, pero sustituye la resistencia a Km por Tc, lo cual lo hace apropiado para nuestra cepa reportera, que es Km^R. La selección se realizó en SMSAm suplementado con Tc y X - Gal, de manera de recuperar clones azules resueltos *in vitro* (posiblemente debido a la presencia de promotores constitutivos clonados *upstream* al miniTn5) y verificar la expresión de β -galactosidasa en medio mínimo y en medio rico. De incluir Km en el proceso de selección de transconjugantes, solo se obtendrían clones no resueltos *in vitro* y no se podría visualizar la expresión de *lacZ*.

Se obtuvieron 4000 clones transconjugantes, con aspecto típico de *R. solanacearum* en el medio SMSAm. Se aislaron 6 clones en agar BG suplementado con TZC; tanto la velocidad de crecimiento en placa como el aspecto de las colonias fue el típico para *R. solanacearum*

Se estriaron los 6 clones en medio Mínimo MP y agar BG completo, ambos suplementados con Tc y X-gal. Todos los clones crecieron bien en ambos medios y desarrollaron color azul intenso, evidenciando la resistencia a Tc y la expresión de β -galactosidasa (Figura 4.3).

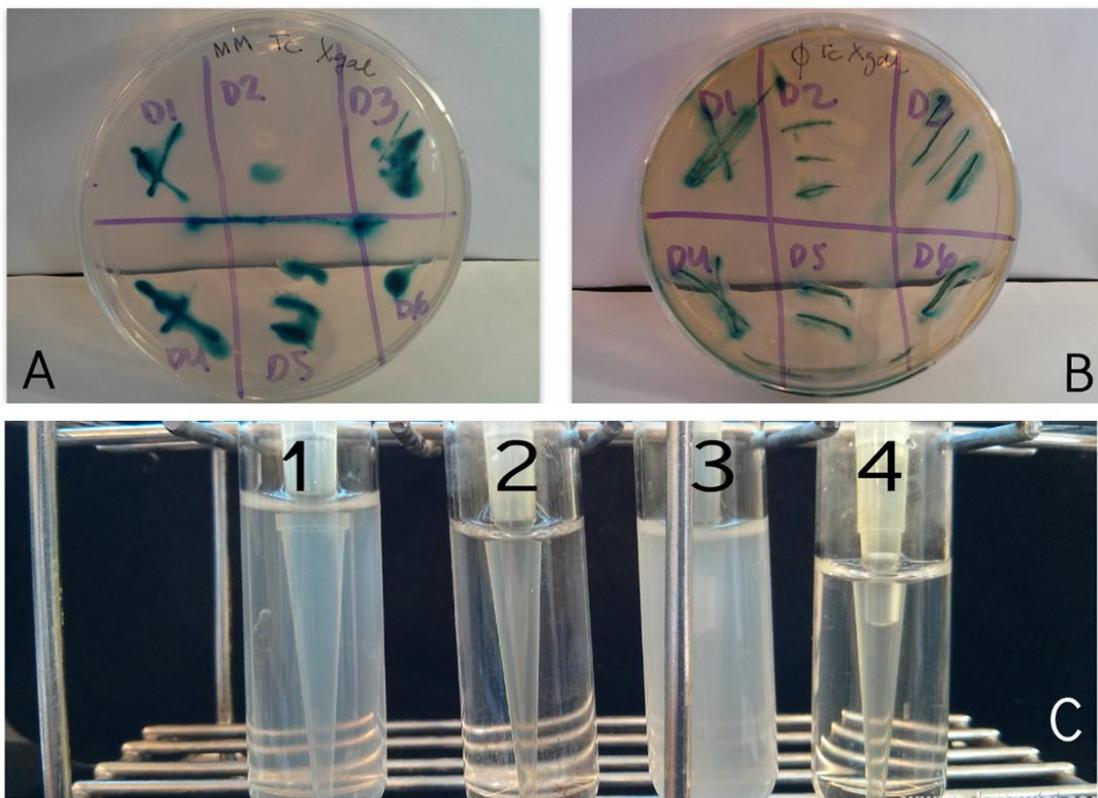


Figura 4.3. Caracterización de clones transconjugantes de *R. solanacearum* UY031_res con el miniTn5. En A: Aislamiento en Medio Mínimo suplementado con Tc y X - Gal de 6 clones que expresan *lacZ*. En el medio de la placa, una estría de *E. coli* como control positivo. En B: Se realizan los mismos aislamientos, pero en medio BG completo suplementado con Tc. En C: Los tubos 1 y 2 corresponden al crecimiento de un mismo clon en Medio Mínimo; en 1 el caldo está suplementado con Tc (se observa crecimiento) y en 2 el caldo está suplementado con Km (no se observa crecimiento, lo cual es esperado en una cepa resuelta). Los tubos 3 y 4 son análogos a 1 y 2 y corresponden al crecimiento de otro clon.

La expresión de la fusión transcripcional *tnpR-lacZ* debe escindir el *cassette res*. Para verificar esto, se inocularon cada uno de los 6 clones en caldo MP suplementado con Tc, y en el

mismo caldo suplementado con Km. En todos los casos, se observó un profuso crecimiento en el tubo con Tc y no se observó crecimiento en el tubo con Km, tras 96 hs de incubación a 28°C. Estos resultados son consistentes con el fenotipo esperado para las cepas resueltas.

Para verificar que las cepas estaban resueltas, se tomó un clon, se extrajo su ADN y se realizó una PCR empleando los *primers* resFEco81I y resREco81I, que se ubican sobre los bordes del *cassette res*. Si el *cassette* no está resuelto, se obtiene un amplicón de 3,3 kb, en tanto el amplicón es de aproximadamente 150 pb si se escindió por acción de la resolvasa TnpR.

El producto de PCR obtenido fue del tamaño esperado; el análisis de secuencia del amplicón confirmó la resolución del *cassette res* (Figura 4.4).

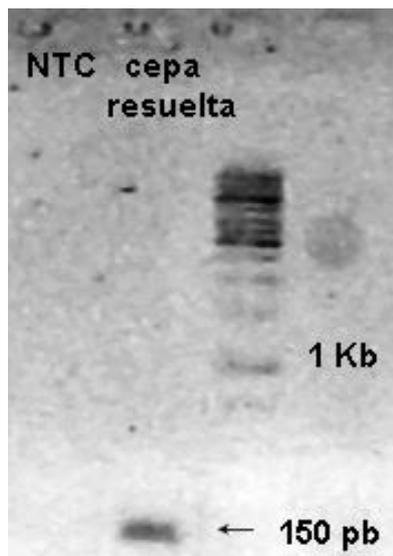


Figura 4.4. Verificación de la resolución del *cassette res* por PCR. Se emplearon *primers* que hibridan en los bordes del *cassette res* y se obtuvo un producto de aprox. 150 pb. La secuenciación del fragmento corresponde con la secuencia esperada en un *cassette resuelto*

4.3.2. Construcción de la biblioteca de transconjugantes de *R. solanacearum* UY031_res con el miniTn5 pMES4.

Se realizaron tres bibliotecas de transconjugantes por duplicado, siguiendo el protocolo de Brown, tal como se describe en el punto 4.2.3., seleccionando los clones transformantes en

medio SMSAm, suplementado con Tc y Km, de manera de obtener clones que no se resuelven *in vitro*. A partir de estas conjugaciones, se obtuvieron aproximadamente 1×10^4 clones transconjugantes.

Se aislaron en forma aleatoria 12 clones transconjugantes en agar BG completo suplementado con TTC, Km y Tc. Todos los clones crecieron con aspecto mucoso y pigmentado, típico de *R. solanacearum*.

Se extrajo el ADN de los clones y se verificó por PCR la identidad de los aislamientos, empleando el par de *primers* 759/760 específicos para *R. solanacearum*. Todos los clones fueron positivos.

Como verificaciones adicionales, se confirmó por PCR la presencia del miniTn5, amplificando una porción del gen *lacZ* de pMES4 de aprox. 1500 pb (*primers* checkTn5F/ checkTn5R) y la no resolución del *cassette res*, empleando *primers* que amplifican una región interna a los sitios *res* en el *cassette* (1400 pb, *primers* UDF/F1resR, ver Tabla 2.2).

Si bien casi todos los clones presentaron el segmento cargo, solo el 50% de los clones amplificaron para el *cassette res*. Estos seis clones (CI6, CI10, CI31, CI58, CI74, CI94) se mantuvieron aislados para realizar ensayos en planta.

4.3.3. Ensayo en planta con clones caracterizados *in vitro*: probando el sistema RIVET.

Se decidió comenzar inoculando solamente un clon para verificar que los tiempos de incubación y la estrategia de recuperación planteada fueran adecuados para lograr los objetivos de la tesis. El primer ensayo en planta se realizó inoculando el clon CI6. Tras 6 días de incubación, las plantas inoculadas presentaron síntomas, en tanto los controles sembrados con agua se mantuvieron sanos. Se preparó un macerado a partir de los tallos de

las plantas enfermas para extraer las bacterias y se realizaron 6 diluciones seriadas en agua. Se sembraron distintos volúmenes de las diluciones en superficie en Agar Nutriente suplementado con Tc. A partir de la placa con colonias aisladas, se reaislaron en Agar Nutriente suplementado con Tc y TZC y en Agar Nutriente suplementado con Km. Todas las colonias crecieron con aspecto típico tanto en el medio con Tc como en el medio con Km, evidenciando que no se habían resuelto. Posiblemente no hubiera un promotor inducible por la planta, clonado *upstream* al miniTn5.

Esta experiencia permitió evaluar el diseño experimental *in vivo*, que demostró ser apropiado. Además, nos permitió establecer que tanto el segmento cargo (con la fusión sin promotor *tnpR-lacZ*) como el *cassette res* se mantienen estables luego de que la bacteria se multiplique durante una semana dentro de la planta.

En un segundo ensayo, se inoculó a la planta con la combinación de los restantes clones caracterizados *in vitro*: Cl10, Cl31, Cl58, Cl74, Cl94. Se realizó el mismo procedimiento y se reaislaron 13 clones que crecieron en Agar Nutriente suplementado con Tc (ANTc) pero que no fueron capaces de crecer en Agar Nutriente suplementado con Km (ANKm). Se nombraron como clones Resueltos: R2, R3, R4, R5, R6, R8, R9, R11, R12, R13, R14, R16 y R17.

En un tercer ensayo se inocularon las plantas con 5000 clones de una de las librerías de transconjugantes. De las placas con colonias contables en ANTc, se reaislaron 140 colonias en ANTc y se replicaron en ANKm. Muchos de estos clones no presentaron el aspecto típico de *R. solanacearum*, y se descartaron como posibles contaminantes. Finalmente, sólo se identificaron 5 clones con el fenotipo típico de *R. solanacearum*, a los que se designaron como clones de la Librería: L3, L13, L24, L40 y L41.

Tanto los clones L como los clones R, se aislaron y se guardaron como clones con potenciales promotores inducibles en la planta para caracterizarlos.

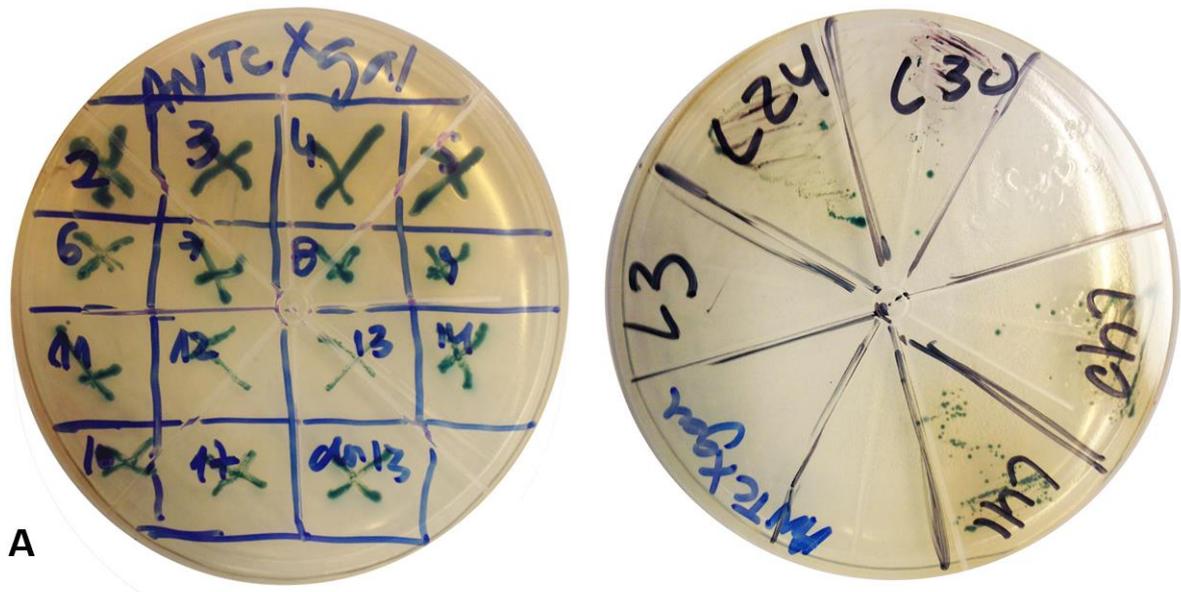
4.3.4. Verificación de clones resueltos L y R.

Los 18 clones (R y L) recuperados de la planta con fenotipo de resolución se estriaron sobre Agar Nutriente suplementado con Tc y Xgal. Todos los clones, sin excepción, desarrollaron el color azul, indicando que la enzima β -galactosidasa se estaba expresando (Figura 4.5 A). Se extrajo el ADN de todos los clones y se amplificó con los pares de *primers* checkTn5F/checkTn5R y UDF/F1resR para verificar la presencia del segmento *cargo* y la ausencia de las porciones internas del *cassette res*.

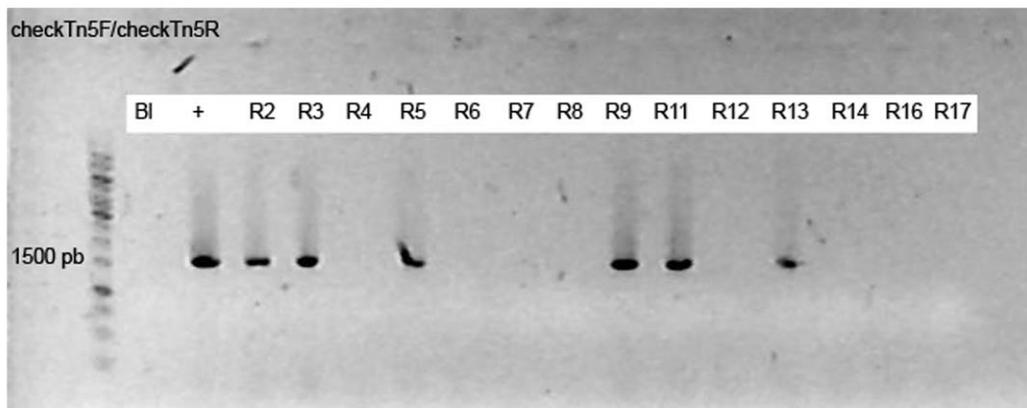
Con el par de *primers* checkTn5F/checkTn5R, se obtuvieron resultados positivos para todos los clones L y para los clones R2, R3, R5, R9, R11 y R13. Este resultado, que es contradictorio con el fenotipo observado, ya que se esperaba que todos los clones R amplificaran, podría deberse a que el segmento *cargo* esté, en algunos clones, en regiones más superenrolladas del genoma y que el acceso de los *primers* se vea dificultado. En la amplificación, se incluyó un control positivo (pMES4) y un blanco de agua (Figura 4.5 B, se muestra la PCR de clones R).

Con el par de *primers* UDF/F1resR, no amplificó ninguno de los clones R y L, a excepción del clon L40. Se empleó como control positivo de la amplificación el ADN del clon no resuelto, Cl6. Tanto el control positivo como el blanco de agua dieron según lo esperado (Figura 4.5 C, se muestra la PCR de clones R).

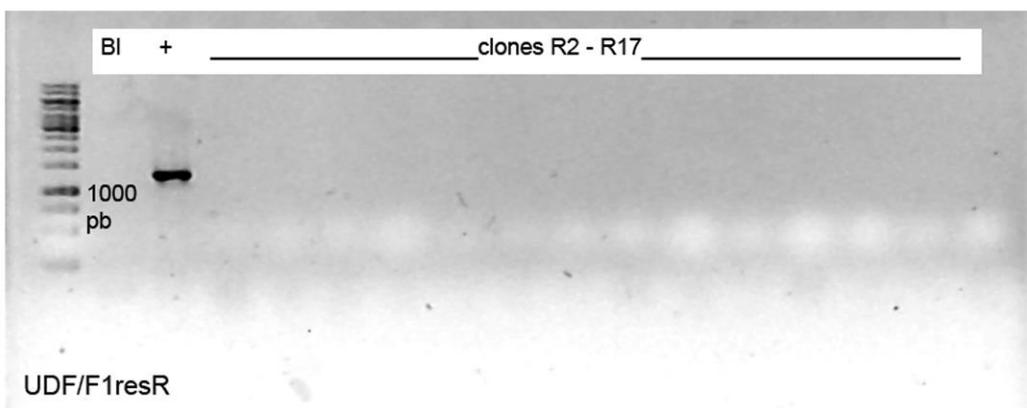
Los clones resueltos se guardaron a -80°C para futuras caracterizaciones.



A



B



C

Figura 4.5. Caracterización de los clones resueltos. En A, clones de *R. solanacearum* recuperados de la planta, resistentes a Tc, sensibles a Km y que expresan *lacZ*; en B, gel de agarosa al 0,8%, en el que se visualiza el resultado de la PCR con primers checkTn5F y checkTn5R para los clones R; en C, gel de agarosa al 0,8%, en el que se visualiza el resultado de la PCR con primers UDF/F1resR. Se confirma que se resolvieron in vivo R2, R3, R5, R9, R11 y R13.

4.4. Discusión.

En este Capítulo se presentó el uso de la herramienta molecular pMES4 (A. Lagares) como alternativa a la librería genómica planteada en el Capítulo 3. Como se explicó en la introducción, pMES4 contiene un miniTn5 y permite la construcción de una librería de transconjugantes mediante la introducción de una región génica que posee la fusión transcripcional *tnpR-lacZ* sin promotor y el gen marcador de Tc^R, flanqueadas por dos regiones mosaico (segmento cargo). Estas regiones mosaico son regiones de reconocimiento para la enzima TnpA, cuyo gen está presente en pMES4, que es la responsable de catalizar la transposición de la región génica descrita, en forma aleatoria, al genoma de la cepa reportera. Si un promotor se induce y está ubicado *upstream* a la fusión *tnpR-lacZ*, permite que la fusión se exprese y que se resuelva la cepa.

Debido a las dificultades enfrentadas en el Capítulo 3 a la hora de llevar a cabo los protocolos de conjugación evaluados, se optó por optimizar el protocolo de conjugación con la cepa de *R. solanacearum* WT (UY031) y *E. coli* SM10 λ pir (pMES1), cuyo uso había sido probado y publicado. En ese contexto, se evaluaron dos protocolos modificados y se escogió uno de ellos, por mostrar un desempeño adecuado a los objetivos de la tesis.

Luego de contar con un protocolo confiable, se realizó la conjugación tripartita con la cepa reportera, la cepa *helper* (pRK2073) y *E. coli* SM10 λ pir con el vector pMES4. La selección se realizó empleando solamente el antibiótico Tc, lo cual permitió seleccionar los clones transconjugantes resueltos y no resueltos. Este paso es útil para recuperar clones transconjugantes resuelto por la inducción de promotores constitutivos y verificar que el sistema funciona *in vitro*. Se aislaron 6 clones y se demostró que expresan la enzima β -galactosidasa tanto en medio nutritivo como en medio mínimo, lo cual es el

comportamiento esperado para los promotores que se inducen en forma constitutiva. Asimismo, se observó la pérdida de la resistencia a Km en caldo de cultivo, que indica que las cepas fueron resueltas, lo cual se verificó en forma molecular para uno de los clones.

Estos resultados alentaron la construcción de tres bibliotecas de transconjugantes independientes de la cepa reportera con pMES4. Se obtuvieron en total aproximadamente $1,0 \times 10^4$ clones transconjugantes. La selección se realizó en medio SMSAm suplementado con Tc y Km. El uso de Km permite eliminar de la población los clones que se resuelven espontánea o constitutivamente, de manera de recuperar solamente los clones no resueltos y evaluar su comportamiento *in vivo*. Se aislaron 12 clones al azar de estas genotecas para verificar que estuviera presente la fusión transcripcional *tnpR-lacZ* y el *cassette res*. Esto se demostró para la mitad de los clones mediante amplificación con *primers* específicos. El resultado de las PCR presentó algunas contradicciones frente a lo observado en medios de cultivo, en el que todos los clones fueron resistentes a Km y Tc. Por este motivo, se decidió hacer una elección conservadora y continuar trabajando sólo con los clones que demostraron tener tanto un fenotipo como un genotipo de no resolución. Estos clones transconjugantes (Cl6, Cl10, Cl31, Cl58, Cl74, Cl94) se emplearon para probar el sistema en la planta.

En una primera etapa se inoculó un único clon en la planta de papa, el clon Cl6, de forma de poder evaluar el diseño experimental mediante un ensayo sencillo, sin interacciones adicionales que podrían dificultar la interpretación del resultado. Se realizó la inoculación en tallo y no en raíz para estandarizar el tiempo de aparición de síntomas y asegurar la introducción del inoculo en la planta. Asimismo, debido a que se desconoce el entorno genético en el que está ubicado el segmento *cargo*, podría ocurrir que algunas cepas del *pool* de transconjugantes tengan afectados genes involucrados con la movilidad y

colonización de la raíz. La inoculación en el tallo de la planta ayuda a minimizar estos sesgos, que son inherentes a la estrategia RIVET.

Luego de la aparición de los primeros síntomas (aproximadamente 6 días post inoculación), se recuperó el clon Cl6. El comportamiento de esta cepa en Agar Nutriente suplementado con Km y/o Tc indicó que no hubo resolución en la planta. Esto podría deberse a que ningún promotor se encontrara *upstream* a la fusión *tnpR-lacZ* o a que, si hubiera un promotor, este no se expresara en las condiciones del experimento. Sin embargo, este primer ensayo en planta permitió sacar dos valiosas conclusiones: a) el diseño experimental de inoculación era útil para los objetivos de la tesis y b) tanto el *cassette res* como el segmento cargo se mantuvieron estables en la cepa durante una semana dentro de la planta, lo cual es un período relativamente largo de incubación. Se guardó Cl6 como control negativo del sistema. En una segunda etapa se inocularon plantas con el subconjunto de clones transconjugantes no resueltos: Cl10, Cl31, Cl58, Cl74, Cl94. Luego de la aparición de los primeros síntomas se recuperaron 13 cepas resueltas: R2, R3, R4, R5, R6, R8, R9, R11, R12, R13, R14, R16 y R17. La identidad de estas cepas se verificó fenotípicamente, por su crecimiento en Agar Nutriente con Tc, ausencia de crecimiento en Agar Nutriente con Km y expresión de actividad β -galactosidasa en medio suplementado con X-gal. Esto se confirmó por PCR con *primers* específicos para *lacZ* y para una región interna del *cassette res*, que se pierde durante el proceso de resolución. Si bien ningún clon amplificó para el *cassette res*, de acuerdo a lo esperado, no se logró amplificar *lacZ* para todos los clones aislados. Este resultado no concuerda con lo observado fenotípicamente. Debido a que el segmento *cargo* puede estar ubicado en distintos entornos genéticos, esta contradicción podrían explicarse por un distinto grado de accesibilidad de los *primers* a la región *target*, debido a la posible presencia de un mayor superenrollamiento o estructuras secundarias.

Estos resultados, tomados en conjunto, demuestran que la estrategia planteada funciona *in vivo* y permite recuperar promotores que se inducen frente a señales de la planta.

En una tercera etapa se emplearon 5000 clones transconjugantes para inocular a la planta. Se recuperaron aproximadamente 150 cepas, de las cuales solamente 5 (L3, L13, L24, L40 y L41) mostraron un fenotipo de resolución. En la verificación molecular, el clon L40 amplificó para el *cassette res*, indicando que era una cepa no resuelta, por lo cual se descartó.

Estos ensayos son preliminares y deberán realizarse repeticiones que incluyan toda la librería de transconjugantes (10000 clones). La manipulación con tantos clones es más dificultosa, por lo cual se propone repetir los ensayos con subconjuntos de la librería de transconjugantes.

Tanto los clones L como R verificados como los clones que se recuperen en futuros ensayos deberán ser caracterizados para generar una lista de promotores que se inducen *in vivo*, una vez que se confirme mediante *Southern Blot* que la inserción del segmento *cargo* es única.

Esta caracterización se puede realizar mediante el uso de *random primers*, tal como describe Martínez -García y de Lorenzo (2012). En esta tesis se realizaron algunos ensayos aplicando esta estrategia, pero no se pudo recuperar ninguna región codificante (no se muestran resultados). Se propone como alternativa digerir el genoma de las cepas resueltas con una enzima de restricción que corte por fuera de las regiones mosaico del pMES4, de forma de mantener el gen de Tc^R intacto. Los ensayos preliminares, resultado del estudio de las secuencias involucradas en el sistema, llevan a proponer *Agel*, ya que no corta al segmento *cargo* y tiene un patrón de alta frecuencia de corte de *R. solanacearum* r3bv2. El genoma, digerido con *Agel*, se deberá clonar en un vector de clonado (que no contenga el gen que otorga resistencia a Tc) y se podrán seleccionar los clones Tc^R, que se secuenciarán y analizarán para generar la lista de promotores.

Consideraciones finales.

La papa (*Solanum tuberosum*), de origen andino, es el cuarto cultivo de importancia del mundo, luego del maíz, arroz y trigo. La FAO, en el contexto del Año Internacional de la Papa (2008) lo llamó “el alimento del futuro”. En muchos países en vías de desarrollo o del tercer mundo, el cultivo de la papa es el principal sustento alimenticio, ya que se adapta a una amplia variedad de sistemas de cultivo y condiciones climáticas y, desde el punto de vista nutricional, es una excelente fuente de energía, vitaminas y antioxidantes (FAO, 2008). El año 2012 se produjeron 364 millones de toneladas en el mundo entero, siendo China el principal productor (National Potato Council, 2014). En Uruguay, es uno de los principales cultivos hortofrutícolas y en el año 2013 se cultivaron unas 5000 hectáreas, principalmente en el departamento de San José (DIEA - MGAP, 2013).

El rendimiento y la calidad del cultivo de papa pueden reducirse dramáticamente por la presencia de patógenos. Uno de ellos es *Ralstonia solanacearum*, que es considerada uno de las 10 bacterias fitopatógenas más importantes del mundo (Mansfield *et al.*, 2012) y que causa la marchera en papa. Esta bacteria se encuentra ampliamente diseminada en los suelos de nuestro país (Siri *et al.*, 2011). La incidencia de este patógeno en los cultivos paperos puede variar de año en año, dependiendo de las condiciones climáticas, las variedades de papa semilla y distintas prácticas agronómicas. El primer reporte de la enfermedad en el país sobre el que se tienen registros es de 1974. El impacto en la zafra de ese año fue devastador, ya que se perdió prácticamente toda la cosecha (Canale, 1983). En 2001-2002 hubo un brote muy importante que afectó al 34% de los predios sembrados

(DIEA-MGAP, 2002). En los últimos años la murchera ha tenido una incidencia moderada en nuestras chacras, pero dado que esta bacteria puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo (Granada y Sequeira, 1983; Hayward, 1991; Elphinstone, 1996; Sanabria *et al.*, 2012) y que se trata de una enfermedad de exclusión (la presencia del patógeno inhabilita la plantación de hospederos susceptibles por un período de años), las probabilidades de nuevos brotes no se descartan.

La bacteria tiene un gran rango de hospederos y está distribuída ampliamente en el mundo, lo cual, unido a que las estrategias de control son limitadas, hacen que sea muy difícil prevenir y controlar los brotes de esta enfermedad. Por estas razones, todo estudio orientado a generar conocimientos sobre la interacción que establece el patógeno con la planta, colabora a mejorar nuestra capacidad de prevenir y controlar la enfermedad.

En los últimos años, y gracias a las nuevas capacidades tecnológicas que permiten secuenciar y analizar un gran volumen de datos, se han llevado a cabo varios estudios que apuntan a estudiar al patosistema *R. solanacearum* – *S. tuberosum* como un todo (Brown y Allen, 2004; Jacobs *et al.*, 2012; Zuluaga *et al.*, 2013). Estos estudios han permitido describir nuevas vías regulatorias, factores de virulencia y proteínas bacterianas que se inducen ante señales de la planta, mejorando la competencia de la bacteria en la colonización del xilema. Se ha postulado que la bacteria podría reconfigurar el metabolismo del hospedero para su propio beneficio y los resultados de estos estudios ponen en tela de juicio algunos paradigmas que han imperado en fitopatología durante los últimos 30 años: que TTSS no se expresa en etapas tardías de la infección y que el xilema es un ámbito nutricionalmente pobre para la bacteria. Estos importantes hallazgos demuestran la importancia de realizar estudios holísticos, y ponen en relieve las limitantes de los estudios realizados en condiciones de laboratorio, que sub dimensionan la participación de la planta en el comportamiento de la

bacteria. Sin embargo, ninguna de las técnicas empleadas en los estudios citados (IVET, *microarrays* de expresión, transcriptómica) permiten estudiar los genes de la bacteria que se inducen sutilmente o transitoriamente. En esto contexto, y con el objetivo de contribuir a la comprensión de la interacción *R. solanacearum* - *S. tuberosum*, surgió esta tesis. En la estrategia RIVET, debido al cambio irreversible que se produce en la cepa reportera una vez que se activa un promotor, cualquier cambio, por débil que sea, puede ser detectado (Hsiao y Zhu, 2009). Existen numerosos antecedentes exitosos sobre la aplicación de la estrategia RIVET en la caracterización de interacciones entre bacterias y plantas (Tamir-Ariel *et al.*, 2007; Gao y Teplitski, 2008; Noel *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2013; Marvasi *et al.*, 2013 Kroupitski *et al.*, 2013, entre otros). En todos los casos, estos estudios mejoraron nuestra comprensión de los enormes cambios metabólicos que ocurren con las bacterias cuando pasan de la vida saprófita a la parásita o simbiote y la relevancia que tienen algunos genes (cuya función se desconocía) en este proceso.

En esta tesis se desarrolló un sistema RIVET funcional para *R. solanacearum* - *S. tuberosum*. Se evaluaron distintas técnicas (microhomología, intercambio alélico) para obtener cepas mutantes de *R. solanacearum*, que permitieron en última instancia generar una cepa reportera apropiada para la estrategia RIVET. Inicialmente se planteó la inserción de un *cassette* reportero (*cassette res*, desarrollado por Camilli *et al.*, 1994) en el gen *pme*, que codifica para una pectinmetilesterasa, ya que en bibliografía se había descrito que el mutante *knock out* para ese gen retenía la capacidad de enfermar a la planta (Tans-Kersten *et al.*, 1998). En el proceso de generar construcciones para la introducción del *cassette res* se dio la formación de quimeras, que no pudieron ser explicadas ni evitadas. Finalmente, se dirigió el *cassette res* a una región que se encuentra *downstream* al gen *glmS*, neutra para la virulencia, lo cual coincide con lo descrito en bibliografía (Yao y Allen, 2007, Monteiro *et*

al., 2012 B). En esa zona se insertó el *cassette res* por doble recombinación homóloga. La cepa resultante se verificó por secuenciación de productos de PCRs dirigidas a la región de la inserción y por *Southern Blot* para verificar que la inserción fue única. Luego se caracterizó la cepa fenotípicamente y se verificó que mantenía su capacidad de crecer y de infectar al hospedero de la misma forma que lo hace la cepa WT. La cepa reportera construida, *R. solanacearum* UY031_*res* presenta, hasta dónde fuimos capaces de evaluar, las mismas características fenotípicas y de agresividad de la cepa WT, que son las características deseables en una cepa reportera.

En una segunda etapa se buscó generar una genoteca de *R. solanacearum* en el plásmido pSLBam9 (generado en el laboratorio de S. Burdman) empleando *E. coli* S17 λ pir e introducir esa genoteca en la cepa reportera mediante una conjugación. Se logró construir una genoteca que representa el 70% del genoma de la bacteria, así como vectores con promotores de función conocida, que permitirían, una vez cointegrados con la cepa reportera, contar con controles para evaluar el funcionamiento del sistema RIVET. La conjugación de la genoteca construida en *E. coli* S17 λ pir con la cepa reportera fue un paso limitante en el desarrollo de la tesis. Se testearon 5 protocolos de conjugación distintos y en ninguno de los casos se obtuvieron clones transconjugantes. Dado que las actividades planteadas en la tesis son secuenciales, no era posible avanzar si no se desarrollaba este punto.

A principios de 2013 se describió un sistema alternativo para llevar a cabo la estrategia RIVET (Lozano *et al.*, 2013). En este nuevo sistema, se mantiene el uso de una cepa reportera pero se sustituye el plásmido pSLBam9 por un miniTn5. El plásmido pSLBam9 es un vector movilizable y suicida en *R. solanacearum*, con un origen de replicación R6K; en donde se replica, se mantiene en la bacteria con bajo número de copias, lo cual es poco eficiente en la

práctica. Los autores proponen sustituirlo por el plásmido pBAM1, que contiene un miniTn5. Este plásmido, una vez conjugado en la cepa reportera, promueve la transposición de una región del plásmido que se encuentra flanqueada por dos regiones mosaico idénticas entre sí. La acción es llevada a cabo por la enzima TnpA. Entre las regiones mosaico se clona el gen que codifica para la resolvasa sin promotor junto con genes marcadores (*lacZ* sin promotor y Tc^R con promotor, en este caso). La idea global es que el miniTn5 se transpone al azar en el genoma y que el promotor adyacente, al expresarse, dirige la expresión de la resolvasa y de la β-galactosidasa, escindiendo el *cassette res* y dando lugar a la formación de colonias azules si se incluye en el medio X-Gal (análogo de lactosa). El Dr. Antonio Lagares, investigador principal en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (La Plata, Argentina) cuyo grupo realizó la publicación antes mencionada nos cedió un plásmido pBAM1 modificado con la fusión *tnpR-lacZ* sin promotor y el gen de resistencia a Tetraciclina (pMES4, no publicado).

El uso de este plásmido permitió optimizar el protocolo de conjugación *E. coli* – *R. solanacearum* e introducir la fusión *tnpR-lacZ* sin promotor en nuestra cepa reportera con éxito. Para verificar que el sistema era funcional *in vitro*, se seleccionó uno de los clones transconjugantes obtenidos, que se expresaba tanto en medio rico como en medio mínimo (clones azules en presencia de X-Gal). Se demostró por PCR y secuenciación que el *cassette res* estaba ausente por acción de la resolvasa.

Finalmente, se inocularon plantas de papa con un *pool* de clones transconjugantes no resueltos en medio rico y se recuperaron unos 18 clones que se resolvieron *in planta*. Estos ensayos son preliminares y deberán realizarse repeticiones que incluyan toda la librería de transconjugantes (1 x 10⁴ clones).

Los 18 clones resueltos en la planta y los clones que se recuperen en futuros ensayos deberán ser caracterizados para generar una lista de promotores que se inducen *in vivo*, una vez que se confirme mediante *Southern Blot* que la inserción de la fusión *tnpR-lacZ* es única. En esta tesis se logró desarrollar un sistema funcional para aplicar la estrategia RIVET al estudio de la interacción *R. solanacearum* r3bv2 – papa y se construyó una biblioteca de transconjugantes (cepa reportera con la fusión transcripcional sin promotor *tnpR-lacZ*) que permite ampliar el estudio realizado a pequeña escala (Capítulo 4). La caracterización de las cepas resueltas *in vivo* en este estudio, sumadas a estudios adicionales, generarán información valiosa para el entendimiento de las relaciones complejas que se establecen entre el patógeno y el hospedero y, en última instancia, aporta al control de la enfermedad.

Bibliografía.

Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO Journal 19(10):2304-14

Arlat M., Van Gijsegem F., Huet J.C., Pernellet J.C., Boucher C.A. 1994. PopAl, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO Journal. 13(3): 543-553

Baker C.J., Neilson M.J., Sequeira L., Keegstra K.G. 1984. Chemical characterization of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 47(5):1096-1100

Barr M., East A.K., Leonard M., Mauchline T.H., Poole P.S. 2008. In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* A34 expressed in the rhizosphere. FEMS Microbiology Letters 282: 219–227

Bentley S.D., Parkhill J. 2004. Comparative genomic structure of prokaryotes. Annual Review in Genetics 38:771-792

Bertolla F., Van Gijsegem F., Nesme X., Simonet P. 1997. Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 63(12):4965-4968.

Bhatt G., Denny T.P. 2004. *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *Journal of Bacteriology* 186(23):7896-7904

Boucher C.A., Barberis P.A., Trigalet A.P., Demery D.A. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *Journal of General Microbiology* 131:2449–2457

Boucher C.A., Gough C.L., Arlat M. 1992. Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annual Review of Phytopathology* 30: 443-461

Boyer H.W., Roulland-Dussoix D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41(3):459-472

Brito B., Aldon D., Barberis P., Boucher C., Genin S. 2002. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15(2):109-119

Burdman S. y Walcott R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Molecular Plant Pathology* 13:805-815

Brito B., Marena M., Barberis P., Boucher C., Genin S. 1999. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 31(1):237-251

Brown D.G., Allen C. 2004. *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Molecular Microbiology* 53 (6): 1641–1660

Brown D.G. 2005. Life in the xylem: the secrets of *Ralstonia solanacearum* pathogenesis revealed by in vivo expression technology. Tesis de doctorado. Ed. Proquest Information and Learning Company, MI, USA

Buddenhagen I.W., Kennedy K.R., Wang C.H. 1966. Comparative carbohydrate catabolism in three different pathogenic strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 56(9):999-1002

Camilli A., Beattie D.T., Mekalanos J.J. 1994. Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 2634–2638

Canale F. 1984. Situación de *Pseudomonas solanacearum* en la República Oriental del Uruguay. Páginas 27-33 en: Seminario de Investigación y trabajo sobre avances en el control de la machitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la Papa en America Latina, CIP, Lima, Perú

Cark L., Carbon J. 1976. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9:91-99

Coll N.S., Valls M. 2013. Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. *Microbial Biotechnology* 6(6):614-620

Cox C.E., McClelland M., Teplitski M. 2013. Consequences of disrupting Salmonella AI-2 signaling on interactions within soft rots. *Phytopathology* 103(4):352-356

Craig J.W., Chang F.Y., Brady S.F. 2009. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chemical Biology* 4(1):23-28

Cunnac S., Occhialini A., Barberis P., Boucher C., Genin S. 2004. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology* 53(1): 115-128 (A)

Dalsing B., Allen C. 2014. Nitrate assimilation contributes to *Ralstonia solanacearum* root attachment, stem colonization, and virulence. *Journal of Bacteriology* 196(5):949

Denny T.P. 2005. A short store of the biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. En: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* specie complex. pp. 437-445. Editado por Allen C., Prior P., Hayward A.A.

Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S., Marco Y. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100(13):8024-8029

DIEA - MGAP. Caracterización de la producción de la papa. Encuesta 2002.

DIEA - MGAP. Encuesta de la papa Otoño 2008.

DIEA - MGAP. Encuesta de la papa Otoño 2013.

Drigues P., Demery-Lafforgue D., Trigales A., Dupin P., Samain D., Asselineau J. 1985. Comparative studies of lipopolysaccharide and exopolysaccharide from a virulent

strain of *Pseudomonas solanacearum* and from three avirulent mutants. Journal of Bacteriology 162 (2): 504-509

Elphinstone J.G., Hennessey J.K., Wilson J.K., Stead D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* in potato tuber extracts. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 26: 663–678

Engelbrecht M.C. 1994. Modification of a selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 10: 3-5.

Erbs G., Newman M.A. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. Molecular Plant Pathology 4 (5): 421–425

FAO. 2008. Potato Fact Sheets

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1127e/i1127e03.pdf>

Fernández M., Conde S., Duque E., Ramos J.L. 2013. In vivo gene expression of *Pseudomonas putida* KT2440 in the rhizosphere of different plants. Microbial Biotechnology 6(3):307-313

Figurski D.H., Helinski D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76(4):1648-1652

Flores-Cruz Z., Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection. Molecular Plant-Microbe Interaction 22(7):773-782

Gabriel D.W., Allen C., Schell M., Denny T.P., Greenberg J.T., Duan Y.P., Flores-Cruz Z., Huang Q., Clifford J.M., Presting G., González E.T., Reddy J., Elphinstone J., Swanson J., Yao J., Mulholland V., Liu L., Farmerie W., Patnaikuni M., Balogh B., Norman D., Alvarez A., Castillo J.A., Jones J., Saddler G., Walunas T., Zhukov A., Mikhailova N. 2006. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 19(1):69-79

Gao M., Teplitski M. 2008. RIVET-a tool for in vivo analysis of symbiotically relevant gene expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(2):162-170

Genin S., Boucher C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology* 3:111-118

Genin S., Brito B., Denny T.P., Boucher C. 2005. Control of the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Letters* 579: 2077-2081

Genin S., Denny T. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review in Phytopathology* 50: 4.1 -4.23

Genin S., Gough C.L., Zischek C., Boucher C.A. 1992. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology* 6(20):3065-3076

Gonzalez E.T., Allen C. 2003. Characterization of *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(6): 536-544

Granada G.A., Sequeira L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 433-440

Grant S.R., Fisher E.J., Chang J., Mole B.M., y Dang J. 2006. Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60:425–449

Grey B.E., Steck T.R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied Environmental Microbiology* 67 (9):3866-3872

Guéneron M., Timmers A.C.J., Boucher C., Arlat M. 2000. Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localizations signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the Hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 36(2):261-277

Hayward A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27: 265-277

Hayward A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 65 -87

Hayward A.C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Bacterial wilt: the disease and the causative agent *Pseudomonas solanacearum*, pp. 9-24. Edited by A. C. Hayward and G. L. Hartman. Willingford. CAB International.

He L.Y., Sequeira L., Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67: 1357-1361

Hernández-Romero D., Solano F., Sanchez-Amat A. 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 71(11):6808-6815

Horita M., Tsuchiya K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 91(4): 399-407

Huang Q., Allen C. 1997. An exo-poly-a-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. Journal of Bacteriology 179(3): 7369-7378

IJSB - List Nro. 57. 1996. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside of IJSB. IJSB. 46: 625-626

Jacobs J.M., Babujee L., Meng F., Milling A., Allen C. 2012. The in planta transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. MBio 3(4): pii: e00114-12

Jacobs J.M., Milling A., Mitra R.M., Hogan C.S., Ailloud F., Prior P., Allen C. 2013. *Ralstonia solanacearum* requires PopS, an ancient AvrE-family effector, for virulence and to overcome salicylic acid-mediated defenses during tomato pathogenesis. MBio. 4(6):e00875-

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6(13):3901-3907

Jin Q. y He S.Y. 2001. Role of the Hrp pilus in type III secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* 294:2556-2558

Kamoun S., Tola E., Kamdar H., Kado CI. 1992. Rapid generation of directed and unmarked deletions in *Xanthomonas*. *Molecular Microbiology* 6(6):809-16

Kang Y., Liu H., Genin S., Schell M.A, Denny T.P. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology* 2: 427–437

Kleihues L., Lenz O., Bernhard M., Buhrke T., Friedrich B. 2000. The H(2) sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *Journal of Bacteriology* 182(10):2716-2724

Kroupitski Y., Brandl M.T., Pinto R., Belausov E., Tamir-Ariel D., Burdman S., Sela Saldinger S. 2013. Identification of *Salmonella enterica* genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by recombinase-based in vivo expression technology. *Phytopathology* 103(4):362-372

Lavie M., Seunes B., Prior P., Boucher C. 2004. Distribution and sequence analysis of a family of type III – dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(8): 931-940

Lavie M., Shillington E., Eguiluz C., Grimsley N., Boucher C. 2002. PopP1, a new member of the YopJ/ AvrRxv family of type III effector proteins, accts as a host-specificity

factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(10): 1058-1068

Li C., Wang K., Hong Y., Chu T., Chu Y., Chou I., Lu D., Chen C., Yang W., Lin Y., Cheng C. 2014. Roles of different forms of lipopolysaccharides in *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(5):471-478

Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L. I., Stackebrandt, E., Hayward, A. C. 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 324-329

Liu H., Kang Y., Genin S., Schell M.A., Denny T.P. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147: 3215- 3229

Liu H., Zhang S., Schell M.A., Denny T.P. 2005. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant-cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(12):1296-1305

Lohou D., Turner M., Lonjon F., Cazalé A.C., Peeters N., Genin S., Vailliau F. 2014. HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a substrate specificity switch domain essential for virulence. *Molecular Plant Pathology*, ahead of print

Lozano M.J., Salas M.E., Giusti M. de L., Martini M.C., López J.L., Salto I., Del Papa M.F., Pistorio M., Lagares A. 2013. Novel *tnpR*-based transposable promoter traps suitable for RIVET studies in different gram-negative bacteria. *Journal of Microbiology Methods* 93(1):9-11

Lozano M.J., Salas M.E., Giusti M.A., Draghi W.O., Torres Tejerizo G.A., Martini M.C., Del Papa M.F., Pistorio M., Lagares A. 2011. Development of new positive-selection RIVET tools: detection of induced promoters by the excision-based transcriptional activation of an *aacCI* (Gm^R)-*gfp* fusion. *Journal of Biotechnology* 155(2):147-155

Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V., Machado M. A., Toth I., Salmond G., Foster G. D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 614–629.

Martínez-García E., Calles B., Arévalo-Rodríguez M., de Lorenzo V. 2011. pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology* 11:38

Martínez-García E., de Lorenzo V. 2012. Transposon-based and plasmid-based genetic tools for editing genomes of Gram-negative bacteria. En: *Synthetic Gene Networks: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 813. Editado por Weber W. y Fussenegger M. Editorial: Springer Science.

Marvasi M., Cox C.E., Xu Y., Noel J.T., Giovannoni J.J., Teplitski M. 2013. Differential regulation of *Salmonella typhimurium* genes involved in O-antigen capsule production and their role in persistence within tomato fruit. *Molecular Plant Microbe Interaction* 26(7):793-800

McGarvey J.A., Denny T.P., Schell M.A. 1999. Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology* 89:1233–1239

Milling A., Babujee L., Allen C. 2011. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. PLoS One 6(1):e15853

Monteiro F, Genin S, van Dijk I, Valls M. 2012. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. Microbiology 158:2107–2116 (A)

Monteiro F, Sole M, van Dijk I, Valls M. 2012. A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 25:557–568 (B)

Monteiro F., Van Dijk I., Solé M., Genin S., Valls M. Visualising the transcription of *Ralstonia solanacearum* key pathogenicity genes in planta (Poster) 2009. XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Quebec, Canada.

Mota J.L., Sorg I., Cornelis G.R. 2005. Type III secretion: the bacteria-eukariotic cell express. FEMS Microbiology Letter. 252: 1-10

Mukaihara T., Tamura N., Murata Y., Iwabuchi M. 2004. Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. Mol. Microbiol. 54(4): pp.863-875

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497

National Potato Council The annual Potato Statistical Yearbook. 2014.
<http://nationalpotatocouncil.org/>

Noel J.T., Arrach N., Alagely A., McClelland M., Teplitski M. 2010. Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by in vivo expression technology. PLoS One 31;5(8):e12406.

Opina N., Tavner F., Hollway G., Wang J.F., Li T.H., Maghirang R., Fegan M., Hayward A.C., Krishnapillai V., Hong W.F., Holloway B.W., Timmis J.N. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum*. Asia Pacific Journal of Molecular Biology 5:19-30

Orgambide G., Montrozier H., Servins P., Roussel J., Trigalet-Demery D., Trigalet A. 1991. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI1000 and the complete structure of the major polysaccharide. Journal of Biological Chemistry 266(13):8312-8321

Osburn A.E., Barber C.E., Daniels M.J. 1987. Identification of plant - induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter - probe plasmid. EMBO Journal 6:23-28

Osorio C.G., Crawford J.A., Michalski J., Martinez-Wilson H., Kaper J.B., Camilli A. 2005. Second-generation recombination-based in vivo expression technology for large-scale screening for *Vibrio cholerae* genes induced during infection of the mouse small intestine. Infection and Immunity 73(2):972-80

Palleroni N.J. y Doudoroff M. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Bacteriology 107:690–696

Palleroni N.J. 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* 149(1):1-7

Peeters N., Carrère S, Anisimova M, Plener L, Cazalé AC, Genin S. 2013. Répertoire, unifiée nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics* 14:859

Pellicic V., Reytrat J.M., Gicquel B. 1996. Positive selection of allelic exchange mutants in *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiology Letters* 144: 161–166

Plener L., Manfredi P., Valls M., Genin S. 2010. PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type III secretion system regulon in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 192:1011–1019

Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679–1692

Pradel E., Ewbank J. J. 2004. Genetic models in pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 38: 347-63

Reed R. R., Grindley N.D. 1981. Transposon-mediated site-specific in vitro: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell* 25:721–728

Remenant B., Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot S., Barbe V., Médigue C., Prior P. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia*

solanacearum species complex reveal significant evolutionary divergence. BMC Genomics 11:379

Reyrat J.M., Pelicic V., Gicquel B., Rappuoli R. 1998. Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. Infection and Immunity 66(9): 4011–4017

Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in Molecular Biology 132:365-86

Russell C.B., Dahlquist F.W. 1989. Exchange of chromosomal and plasmid alleles in *Escherichia coli* by selection for loss of a dominant antibiotic sensitivity marker. Journal of Bacteriology 171(5): 2614–2618

Safni I., Cleenwerk I., De Vos P., Fegan M, Sly L., Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* , *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., Banana Blood Disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. [Epub ahead of print]

Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangenot S., Arlet M., Billault A., Brottier P., Camus J.C., Católico L., Chandler M., Choisine N., Claudel – Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robet C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thébault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C.A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature. 415: 497-502

Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanabria A., Siri M.I., Cecchetto G., Pianzola M.J. 2012. Aplicación de la técnica de PCR en la detección de *Ralstonia solanacearum* en campos paperos. *Innotec* 7: 49-54

Schell M. A. 1987. Characterization and purification of endoglucanase of *Pseudomonas solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(9):2237-2241

Schell M.A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* 38: 263-292

Seal S.E., Jackson L.A., Daniels M.J. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3759 - 3761

Sequeira L. 1985. Surface components involved in bacterial pathogen-plant host recognition. *Journal of Cell Science Supplement* 2: 301-316

Silby M.W., Cerdeño-Tárraga A.M., Vernikos G.S., Giddens S.R., Jackson R.W., Preston G.M., Zhang X.X., Moon C.D., Gehrig S.M., Godfrey S.A., Knight C.G., Malone J.G., Robinson Z., Spiers A.J., Harris S., Challis G.L., Yaxley A.M., Harris D., Seeger K., Murphy L., Rutter S., Squares R., Quail M.A., Saunders E., Mavromatis K., Brettin T.S., Bentley S.D., Hothersall J., Stephens E., Thomas C.M., Parkhill J., Levy S.B., Rainey P.B., Thomson N.R. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10(5):R51

Simon R., Priefer U., Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-790

Siri M. I., Sanabria A., Pianzola M. J. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Disease* 95:1292-1301

Siri M.I., Sanabria A., Boucher C., Pianzola M.J. 2013. New type IV pili-related genes involved in early stages of *Ralstonia solanacearum* potato infection. *Molecular Plant Microbe Interaction* (7):712-274

Smith E.F. 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant, and Irish potato (*Bacillus solanacearum* n. sp.). Washington. Government Printing Office.

Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503–517

Stalker D.M., Kolter R., Helinski D.R. 1979. Nucleotide sequence of the region of an origin of replication of the antibiotic resistance plasmid R6K. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76 (3):1150-1154

Taghavi M., Hayward C., Sly L.I., Fegan M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the Blood Disease Bacterium of banana based on 16S rRNA Gene Sequences. *IJSB*. 46(1):10–15

Tamir-Ariel D., Navon N., Burdman S. 2007. Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. *Journal of Bacteriology* 189(17):6359-6371

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Tasset C., Bernoux M., Jauneau A., Pouzet C., Brière C. 2010. Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R-mediated immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog* 6(11): e1001202

Titarenko E., López-Solanilla E., García-Olmedo F., Rodríguez-Palenzuela P. 1997. Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *Journal of Bacteriology* 179(21): 6699-6704

Tans-Kersten J., Guan Y., Allen C. 1998. *Ralstonia solanacearum* methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4918 – 4923

Tans-Kersten J., Huang H., Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* 183(12):3597–3605

Uchiyama T. y Watanabe K. 2007. The SIGEX Scheme: High Throughput Screening of Environmental Metagenomes for the Isolation of Novel Catabolic Genes. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 24:107-116

Unsworth K. E., Holden D.W. 2000. Identification and analysis of bacterial virulence genes *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355:613–622

Valls M., Genin S., Boucher C. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* 2:e82

Van Elsas J.D., Kastelein P., de Vries P.M., van Overbeek L.S. 2001. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 842–854

Van Gijsegem F., Vasse J., De Rycke R., Castello P., Boucher C. 2002. Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for the Hrp pilus assembly. *Molecular Microbiology* 44(4): 935-946

Van Gijsegem F., Vasse J., Camus J.C., Marena M., Boucher C. 2000. *Ralstonia solanacearum* produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Molecular Microbiology* 36(2):249-260

Vasse J., Frey P., Trigalet, A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8(2):241-251

Wang X., Liang G. 2014. Control Efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*. *Biomed Research International* 465435

Wassenaar T., Gaastra W. 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiology Letters* 201: 1-7

Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology Immunology* 36: 1251-1275

Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) com. nov. *Microbiology Immunology* 39: 897–904

Yang W.C., Lin Y.M., Cheng Y.S., Cheng C.P. 2013. *Ralstonia solanacearum* RSc0411 (lptC) is a determinant for full virulence and has a strain-specific novel function in the T3SS activity. *Microbiology* 159(Pt 6):1136-1148

Yang S., Perna N.T., Cooksey D.A., Okinaka Y., Lindow S. E., Ibekwe M., Keen N.T., Yang C.H. 2004. Genome-wide identification of plant-upregulated genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 using a GFP-based IVET leaf array. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17 (9): 999-1008

Yao J., Allen C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 188(10): 3697–3708

Zhu H., Dean R.A. 1999. A novel method increases the transformation efficiency by 70-fold in the construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library. *Nucleic Acids Research* 27: 910-911

Zuluaga A.P., Puigvert M., Valls M. 2013. Novel plant inputs influencing *Ralstonia solanacearum* during infection. *Frontiers Microbiology* 4:349

Anexo I.

AI.1. Introducción.

Tal como se explicó en el Capítulo 2, la cepa de *Ralstonia solanacearum* UY031 se empleó para la obtención de una cepa reportera, a la que llamamos *R. solanacearum res*. De acuerdo al fundamento de la estrategia RIVET, esta cepa debe incorporar el *cassette res* (*res-Km^R-sacB-res*) en una región del genoma de forma tal que no se afecte la capacidad de enfermar del patógeno.

Se llevó a cabo un estudio bibliográfico para conocer si existían antecedentes de genes de *R. solanacearum* que al ser mutados no afectaran la virulencia de la bacteria.

En bibliografía se describió que los mutantes *R. solanacearum* en los genes que codifican para la pectinmetilesterasa (*pme*) y de la vía de síntesis del sideróforo (*ssd*), no exhibían alteraciones en su capacidad de enfermar al hospedero (Trans-Kersten *et al.*, 1998; Bhatt y Denny, 2004). Estos genes parecerían ser excelentes candidatos para ser interrumpidos por el *cassette res*. Además, basándonos en la revisión de Genin y Boucher (2004), se incluyó en la lista de genes candidatos a ser interrumpidos por el *cassette res* a los genes de resistencia a metales, ya que se considera poco probable que estos genes estén implicados en la virulencia de la bacteria en planta. La lista de genes candidatos a ser mutados se resumen en la Tabla AI.1. Si bien sólo se requiere un mutante que cumpla con las características antes mencionadas, es necesario generar más de una opción por si algún mutante no se comporta de la forma esperada, ya que los estudios citados evaluaron la interacción de distintas cepas

de *R. solanacearum* con tomate. En ninguno de los casos se usó la cepa UY031 ni al hospedero *Solanum tuberosum*.

Tabla AI.1

Referencia	Gen candidato
Applied and Environmental Microbiology Vol. 64, No. 12 p. 4918–4923 Trans Kersten et al 1998	<i>pme</i> pectin metilesterasa
Journal of Bacteriology Vol. 186 No. 23 p. 7896-7904 Bhatt y Denny, 2004	<i>ssd</i> síntesis de siderofóro
Annual Review of Phytopathology Vol.42 p.107-134. Genin y Boucher, 2004	genes de resistencia a metales

En un primer abordaje, que se desarrolló durante el primer año y medio de la tesis, se intentó introducir el *cassette res* en el gen *pme* mediante dos estrategias: a) obtención de la cepa reportera por doble recombinación homóloga y b) obtención de la cepa reportera por reemplazo alélico. Ninguna de las estrategias permitió obtener una cepa reportera funcional. A continuación se explica en forma breve la estrategia planteada y los resultados obtenidos.

AI.2. Obtención de la cepa reportera por doble recombinación homóloga.

El esquema de trabajo planteado se indica en la Figura AI.1. Se diseñaron *primers* para amplificar el gen *pme* (1000 pb) a partir de la cepa UW551 de *R. solanaceum*. Este gen posee un único sitio de restricción *NcoI* en la mitad del amplicón (aproximadamente a los 500 pb). La amplificación del gen se realizó en forma exitosa y se clonó en el vector T pZT57R/T (3 kb, Fermentas). El plásmido obtenido se denominó ppmeZT.3. En paralelo se amplificó el *cassette res* (3 kb), con *primers* con *overhangs* que incluyó el sitio *NcoI* (similares a los

primers resFEco81I/resREco81I, Tabla 2.2, pero sustituyendo el sitio de restricción). Este gen también se clonó en el vector T pZT57R/T para obtener el plásmido presZT.9. Ambos vectores se transformaron en *E. coli* DH5 α mediante electroporación.

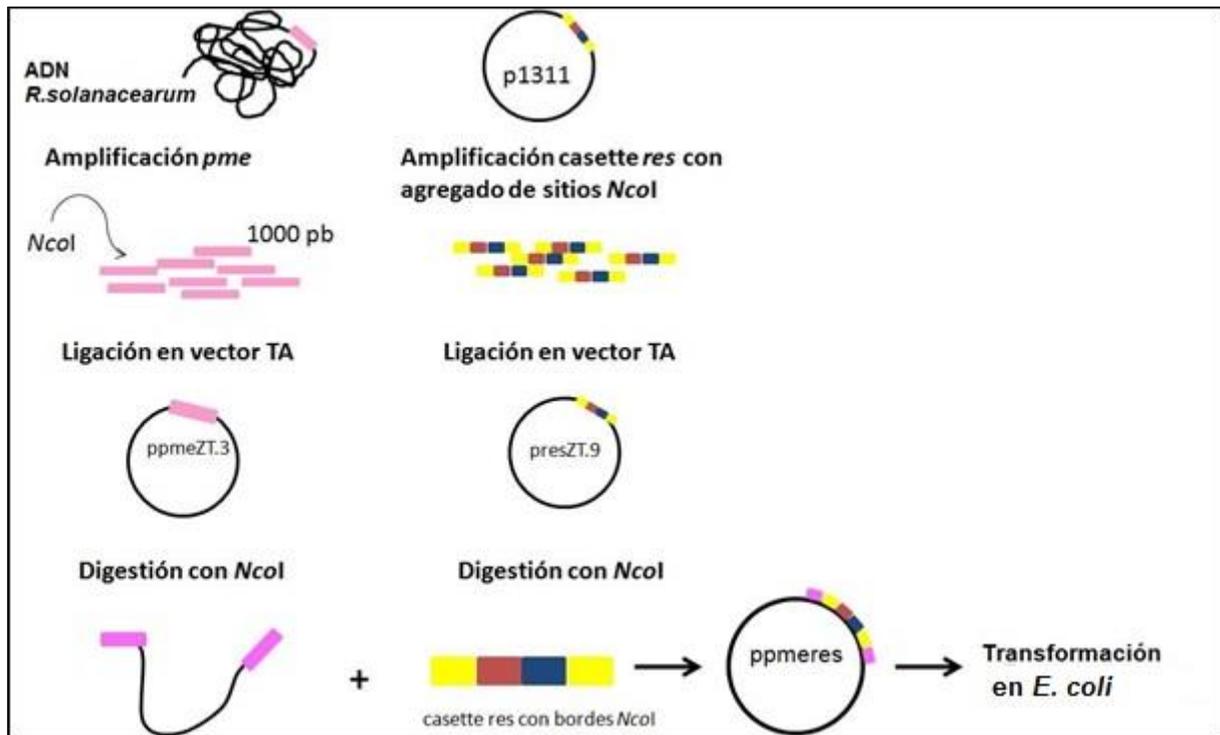


Figura AI.1 Estrategia realizada para la obtención de la cepa reportera mediante doble recombinación homóloga en el gen *pme* de *R. solanacearum*.

Los plásmidos obtenidos en cada caso fueron verificados por restricción con endonucleasas y por análisis de secuencia de los insertos. En una segunda etapa se buscó generar la construcción *pme-res*, digiriendo tanto ppmeZT.3 como presZT.9 con *Nco*I y ligando el *cassette res* liberado en el único sitio *Nco*I de ppmeZT.3, de forma tal de obtener una construcción en la que el *cassette res* estuviera flanqueado por unos 500 pb del gen *pme* a cada lado, tal como se muestra en la Figura AI.1. La ligación del fragmento de 3 kb (*cassette res*) purificado a partir de presZT.9 con el plásmido linearizado y desfosforilado ppmeZT.3 se realizó 9 veces, variando las condiciones de trabajo. En todos los casos se incluyeron

controles positivos y negativos, que dieron los resultados esperados. En 5 de esos ensayos no se obtuvieron clones transformantes. En los restantes 4 ensayos, se obtuvieron clones con una baja eficiencia de transformación. En total se analizaron 66 clones mediante PCR usando los *primers* SP6/T7 y mediante restricción con las enzimas *NcoI* y *ScaI*. Para la restricción con *NcoI* se esperaban dos productos de digestión: uno de 3,3 kb (escisión del *cassette*) y otro de 4 kb (el vector) en tanto para la restricción con *ScaI* el resultado esperado era la linearización de los plásmidos con un producto único de digestión de 7 kb. La mayoría de los clones analizados presentaba un inserto menor al esperado. Se examinaron 7 clones por análisis de secuencias, que evidenciaron que habrían ocurrido rearrreglos internos dentro del inserto, con fragmentos del *cassette* eliminados, entre ellos el gen Km^R . Pese a esto, todos los clones seleccionados eran resistentes a kanamicina. Una hipótesis planteada para explicar estos resultados fue que la cepa *E. coli* DH5 α podría estar defectuosa o que la mutación de *recA* podría haber revertido, permitiendo eventos de recombinación entre el plásmido y el genoma de *E. coli*. Sin embargo, repeticiones del ensayo empleado *E. coli* Top Ten no apoyaron esta hipótesis, ya que se obtuvieron resultados similares.

En conclusión, mediante esta estrategia no fue posible obtener la construcción deseada bajo las condiciones ensayadas. Se decidió dejar de lado esta estrategia y explorar la técnica de microhomología mediada por PCR para la obtención de la cepa reportera.

AI.3. Obtención de la cepa reportera por microhomología mediada por PCR.

La técnica de microhomología mediada por PCR para obtener microorganismos mutantes se ha aplicado exitosamente en *Saccharomyces cerevisiae* y otros hongos. Brevemente, la

técnica consiste en (i) diseñar *primers* para amplificar el gen marcador con colas flanqueantes que exhiban homología al gen candidato a ser mutado, (ii) transformación del microorganismo con el producto de amplificación y (iii) selección de transformantes (Manivasakam *et al.*, 1995). Según Datsenko y Wanner (2000), esta técnica podría ser aplicada en las bacterias naturalmente competentes, tal como lo es *R. solanacearum*. Si bien hasta la fecha no se ha descrito la aplicación de microhomología en *R. solanacearum*, algunos trabajos sugieren (Bertolla *et al.*, 1997; Coupat *et al.*, 2008) que en esta bacteria alcanzarían fragmentos homólogos de 50 pb para llevar a cabo una transformación natural con éxito. La estrategia global se esquematiza en la Figura A1.2.

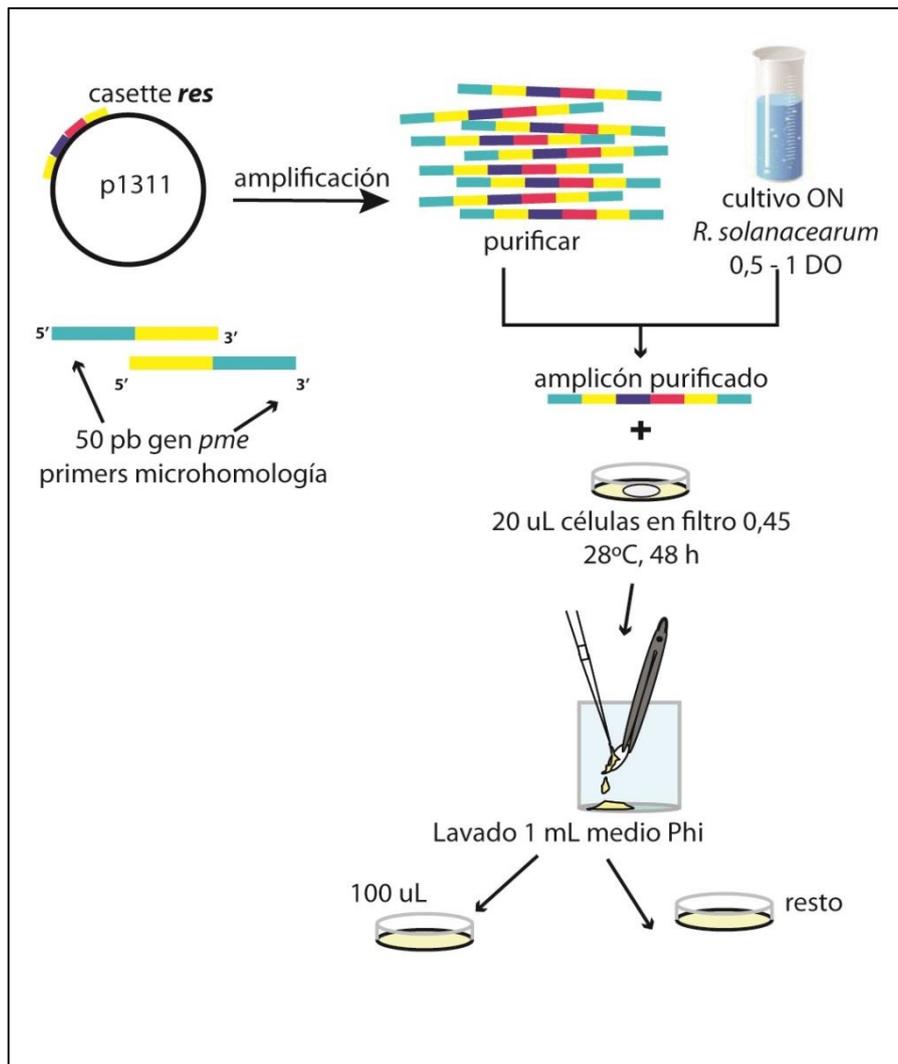


Figura AI.2. Estrategia realizada para la obtención de la cepa reportera mediante microhomología mediada por PCR.

Se diseñaron *primers* para generar la construcción *pme-res*. Se partió de los *primers* resFEco81I/resREco81I (Tabla 2.2) y se sustituyó el sitio de restricción *Eco81I* de cada por 50 pb homólogos a los extremos del gen *pme* (en el primer *forward*, el extremo 5' del gen y en primer *reverse*, el extremo 3' del gen). El *cassette res* fue amplificado con estos *primers* de 70 pb a partir del plásmido p1311, cedido por Saúl Burdman, tras una laboriosa optimización de las condiciones de amplificación. El producto de amplificación, denominado pmeresMH, se ligó con el vector T pGEM T-Easy (Promega) y la mezcla de ligación se usó para electroporar *E. coli* Top Ten. Se analizaron varios clones transformantes mediante PCR con los *primers* Sp6/T7, por restricción con la endonucleasa *ScaI* (que lineariza el vector y permite verificar que el plásmido tenga el inserto de aprox. 3 kb) y por análisis de secuencias con los *primers* secresF2-4 y secresR2-4 (Tabla 2.2). Al plásmido confirmado se le denominó ppmeresMH. Se realizaron 3 transformaciones naturales tal como se describe en el Capítulo 2, empleando el producto de amplificación o el plásmido ppmeresMH sobre la cepa de *R. solanacearum*. Se seleccionaron 10 clones transformantes resistentes a kanamicina. Sin embargo, la caracterización molecular y por secuenciación de estos clones no demostró tener la inserción del *cassette res* en la región del gen *pme*. Por estas razones, se replanteó la estrategia de construcción de la cepa reportera, tal como se detalla en el Capítulo 2 de esta tesis.

Anexo II.

Agar BG con 2,3,5-trifeniltetrazolio (TZC). (Boucher *et al.*, 1985)

Peptona.....	10 g
Extracto de levadura	1 g
Hidrolizado de caseína	1 g
Dextrosa	5 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL

Se realizaron las tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7,0. Se calentó a ebullición para fundir el agar. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se dejó enfriar a 45-50°C y se agregaron 5 ml de una solución de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TZC, 1% p/v) previamente esterilizada por filtración. Inmediatamente el medio se homogeneizó y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16 - 24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso y por no más de 90 días.

En el caso de preparar caldo BG, se omitió la incorporación de TZC y de agar y no se llevó a punto de ebullición previo a la esterilización por autoclave.

Agar Nutriente

Agar nutriente (Difco)	23 g
Agua destilada	1000 mL

Se realizaron la toma en peso del medio deshidratado y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso y por no mas de 90 días.

Caldo Nutriente

Caldo nutriente (Difco).....	23 g
Agua destilada	1000 mL

Se realizaron la toma en peso del caldo deshidratado y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso y por no mas de 90 días.

Medio SMSA modificado (SMSAm, Elphinstone *et al.*, 1996).

Peptona.....	10 g
Glicerol	5 mL
Hidrolizado de caseína	1 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL

Se realizaron las tomas de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se calentó a ebullición para fundir el agar, se dejó enfriar a 50°C y se ajustó el pH del medio a 7,0. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se dejó enfriar a 45-50°C y se agregaron las soluciones que se indican a continuación las cuales fueron previamente esterilizadas por filtración.

Antibiótico	Concentración (%)	Volumen agregado (ml)	Concentración final en el medio (mg/l)
Polimixina B sulfato	1	10	100
Cicloheximida	1	10	100
Bacitracina	1	2,5	25
Penicilina G	0,1	0,5	0,5
Cloranfenicol	1	0,5	5
Cristal violeta	1	0,5	5
2,3,5-trifeniltetrazolio	1	5	50

Inmediatamente el medio se homogeneizó y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura

ambiente durante 16 a 24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso y por no más de 90 días. En el caso de preparar caldo SMSAm, se omitió la incorporación de agar y no se llevó el caldo a punto de ebullición previo a la esterilización por autoclave.

Medio Mínimo para *R. solanacearum*

SOLUCIONES MADRE

KH ₂ PO ₄	200 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g/L
MgSO ₄ .7H ₂	10 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	125 mg/100 mL

Se prepararon las soluciones madres detalladas. Luego, se preparó el medio 2X a partir de las soluciones madre, de acuerdo a lo siguiente: 34 mL de KH₂PO₄, 20 mL de (NH₄)₂SO₄, 10 mL de MgSO₄.7H₂ y 200 µL de FeSO₄.7H₂O. Se agregó agua hasta completar el litro. El pH se ajustó 7 con KOH 1M. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

En el momento de usar, se preparó el medio mínimo 1x agregando además la fuente de carbono de la siguiente forma: para 10 mL de medio mínimo se empleó 5 mL de medio mínimo 2X, 4,7 mL de agua destilada estéril y 330 µL de glicerol estéril 60% vol-vol.

En caso de necesitar medio mínimo sólido, se preparó incluyendo agar en una concentración de 18 g/L.

Luria Bertani Agar (LB, Sambrook y Russel, 2001)

Triptona	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
NaCl.....	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL

Se realizaron las tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7,0. Se calentó a ebullición para fundir el agar. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se dejó enfriar a 45-50°C y se agregaron antibióticos en caso de corresponder. Inmediatamente el medio se homogeneizó y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16 - 24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso y por no más de 90 días.

En el caso de preparar caldo LB, se omitió la incorporación de agar y no se llevó a punto de ebullición previo a la esterilización por autoclave.

Murashige Skoog Agar (Papa multiplicación, Murashige y Skoog, 1962)

Micro y macronutrientes	mg/L
Nitrato de amonio.....	1650
Ácido bórico	6,20
Cloruro de calcio	440
Cloruro de cobalto .6H ₂ O	0,025
Sulfato de cobre.5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,30
Sulfato ferroso.7H ₂ O.....	27,80
Sulfato de magnesio.7H ₂ O.....	370
Sulfato de manganeso.4H ₂ O.....	22,30
Molibdato de sodio.....	0,25
Ioduro de potasio.....	0,83
Nitrato de potasio.....	1900
Fosfato monobásico de potasio.....	170
Sulfato de Zinc. 7H ₂ O.....	8,60
Agar.....	9000

Vitaminas	mg/L
Myo Inositol	100
Acido fólico.....	0,5
Biotina.....	1

Cloro colina.....	1
Acido pantoténico.....	1
Tiamina	1
Nicotinamida	2
Piridoxina	2
Acido aminobenzoico	2

Se realizaron las tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 5,0. Se calentó a ebullición para fundir el agar. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Inmediatamente el medio se homogeneizó y se repartió en botellas de 10 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las botellas se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Anexo III.

Se adjunta un CD con las secuencias de ADN, resultado de esta tesis.

Esta tesis se llevó a cabo gracias a las siguientes agencias financiantes:

