

ESTUDIO DEL CÁNCER BACTERIANO EN JITOMATE: DETECCIÓN CERTERA Y ESTRATEGIAS PARA BÚSQUEDA DE GENES QUE CONFIERAN RESISTENCIA A ESPECIES COMERCIALES.

López Hernández, L.R. ⁽¹⁾; Alpuche Solís, A.G. ⁽²⁾; Esparza Araiza, M. ⁽²⁾; Hernández Rico, E. ⁽²⁾

⁽¹⁾Licenciatura en Biotecnología

Universidad Autónoma de Querétaro

⁽²⁾División de Biología Molecular

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

RESUMEN

Se analizaron por métodos microbiológicos, hojas, tallos y frutos de 25 muestras de jitomate con síntomas de infección por patógenos provenientes de diferentes regiones de San Luis Potosí; la confirmación de la presencia del cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) se realizó por métodos moleculares (PCR).

Por otro lado, contábamos con datos del despliegue diferencial de genes analizados por cDNA-AFLPs de plantas silvestres resistentes a la enfermedad (*S.peruvianum* 2157 y *S. peruvianum* 2172). Se cree que estos genes expresados posteriormente a la infección de la bacteria en especies resistentes, pueden conferir resistencia a especies comerciales de jitomate al ser transferidos por ingeniería genética. Una estrategia en la búsqueda de estos genes es emplear vectores virales para silenciarlos y ver pérdida de resistencia, por lo que se clonaron tres genes candidatos (Perox_Secr 75, SCE1 475 y PP2C 75) en dos vectores de silenciamiento, Tomato Mottle Virus (ToMoV) y Tobacco Rattle Virus (TRV).

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los principales cultivos a nivel mundial, sin embargo es afectado por diversos patógenos que incluyen hongos, bacterias, virus y nemátodos. Dentro de las bacterias fitopatógenas sobresale *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), una bacteria Gram positiva causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate, para la cual no existen tratamientos curativos o preventivos eficientes. Sin embargo, las especies silvestres relacionadas a jitomate *Solanum peruvianum* y *Solanum habrochaites*, han mostrado resistencia a esta enfermedad. Se cree que genes presentes en estas especies pueden inducirse al presentarse la infección por Cmm, con lo que el contar con una técnica que pueda detectar genes inducibles después de la infección, nos podría permitir su aislamiento y clonación para su posterior transferencia a especies comerciales de jitomate mediante técnicas de ingeniería genética, lo cual repercutiría en una reducción en el uso de agroquímicos y mejoras en producción y calidad de fruto.

Existen varias técnicas de despliegue diferencial de genes inducidos por factores externos, dentro de éstas el cDNA-AFLP nos permite analizar transcriptomas sin conocer el genoma de la planta y de una manera económica; los posibles fragmentos de genes generados deben ser validados por PCR en tiempo real y además probados de manera indirecta antes de sobreexpresarlos en especies comerciales susceptibles. Una estrategia para elegir un buen gen candidato es el silenciamiento de los mismos en plantas resistentes, para lo cual se usan vectores virales (VIGS). En este trabajo se usaron los vectores de silenciamiento Tobacco Rattle Virus (TRV) y Tomatle Mottle virus (ToMoV), para buscar la pérdida de función mediante la degradación post-transcripcional de ARN de doble cadena generando ARN de interferencia. El silenciamiento genético inducido por TRV ha sido exitoso en diversas especies de plantas, donde la inoculación se ha realizado generalmente por infiltración forzada en hojas con *Agrobacterium tumefaciens*, transformado con secuencias virales (agroinfiltración) pero no se ha probado en especies silvestres. Posteriormente al

silenciamiento se reta a la planta con Cmm para ver si ahora se ha vuelto susceptible, en caso de que se confirme la sintomatología se asume que el gen silenciado es responsable de la resistencia. En esta estancia se logró obtener clonas con insertos de genes presuntamente involucrados en la resistencia a *Cmm*.

METODOLOGÍA

Detección de patógenos de jitomate por métodos moleculares y microbiológicos.

A partir de plantas de jitomate, se tomaron fragmentos de hojas, tallo y fruto que presentaban síntomas de infección por patógenos. Se eliminaron saprófitos sumergiendo en cloro al 2% por 15 min y agitando cada 5 min. Se hicieron 5 lavados para eliminar totalmente el cloro y se procedió a cultivar durante 2 días a 28°C en YPDA y en medio semiselectivo para *Cmm* (CMM1). Una vez que hubo crecimiento bacteriano y fúngico, se realizó tinción de Gram para las bacterias y tinción de azul algodón para los hongos, realizando observación microscópica para identificar los patógenos. Para confirmar la infección por *Cmm* se realizó extracción de ADN del tejido y se verificó la calidad del ADN en gel de agarosa. Posteriormente se realizaron diluciones 1:100 del ADN obtenido y se les realizó la reacción en cadena de la polimerasa PCR (2 min a 94°C y 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 58°C y 60 s a 72°C y fase final de elongación 10 min a 72°C). Al resultado de la PCR se le hizo electroforesis junto con un control positivo para *Cmm*, logrando así confirmar que muestras estaban infectadas con *Cmm*. Adicionalmente se utilizó el Kit InmunoStrip test para confirmar infección por TSWV.

Clonación de fragmentos de genes de especies silvestres de jitomate presuntamente responsables de la resistencia a Cmm en vectores de silenciamiento.

A partir del ARN de las plantas retadas con *Cmm* con los datos obtenidos de un trabajo anterior de cDNA-AFLP, se sintetizó cDNA utilizando el kit SuperScript II RT. Una vez obtenido el cDNA se llevó a cabo un PCR con oligos de actina (5 min a 94°C y 28 ciclos de 30 s a 94°C, 50 s a 58°C y 110 s a 72°C y fase final de elongación 10 min a 72°C) y mediante su electroforesis se confirmó la síntesis de cDNA observando una banda de 600pb. Posteriormente el cDNA fue usado para amplificar cada gen candidato [modificador tipo ubiquitina (SCE1), peroxidasa secretora (Perox_Secr) y gen involucrado en defensa y señalamiento (PP2C)]. Se realizó un PCR para la amplificación del fragmento seleccionado de cada gen (5 min a 94°C y 35 ciclos de 30 s a 94°C, 50 s a 58°C y 90 s a 72°C y fase final de elongación 10 min a 72°C) y mediante electroforesis se confirmó el amplicón correspondiente de acuerdo a su tamaño (156 pb para PP2C, 159 pb para SCE y 179 pb para Perox_Secr). Posteriormente se realizó la digestión de los mismos; así como de los vectores de silenciamiento, con las respectivas enzimas de restricción, para ToMoV se utilizaron *EcoRI* y *HindIII* (toda la noche a 37°C) y para TRV *SmaI* (toda la noche a 25 °C) y *EcoRI* (2h a 37°C). Posterior a esto, se ligó el gen y el vector de silenciamiento mediante el uso de ligasa T4 incubando 24h a 4°C. Con la ligación obtenida se transformó por choque térmico de células competentes (*E. coli* top10F'). Las colonias blanco obtenidas se seleccionaron y se procedió a inocular tubos de 3 mL con medio LB y antibiótico (ampicilina para ToMoV y Kanamicina para TRV), esto se hizo picando con un palillo la colonia y transfiriéndolo al tubo, incubando a 36°C por 24h. A partir de los medios de cultivo se obtuvieron los plásmidos (Minipreps), los cuales se trataron con sus respectivas enzimas de restricción, para posteriormente confirmar mediante electroforesis si hubo liberación del inserto de los genes en el vector. La confirmación de estos vectores se realizará por secuenciación. Una vez confirmada la secuencia se utilizará el vector para el bombardeo y el silenciamiento de genes.

RESULTADOS

Detección de patógenos de jitomate por métodos microbiológicos y moleculares.

En las muestras de tejido vegetal se encontró la presencia tanto de bacterias Gram (+), Gram (-) hongos y virus. Se realizó extracción de ADN, PCR y electroforesis para confirmación de infección por *Cmm* (Figura 1). Doce muestras fueron positivas para *Cmm* (Tabla 1).

TABLA 1. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS (M), INMUNOLÓGICOS (I) MOLECULARES (PCR) DE MUESTRAS ENFERMAS.

Muestra	Tejido	Diagnóstico
762	Hoja y tallo	Cmm + (PCR)
763	Hoja	Cmm + (PCR)
765	Hoja	Cmm + (PCR)
783	Hoja	Cmm + (PCR)
784	Hoja	Cmm + (PCR)
785	Hoja	Cmm + (PCR)
787	Hoja	Bacilos Gram (+) (M)
788	Hoja	Cmm + (PCR)
789	Hoja	Cmm + (PCR)
791	Hoja	Cmm + (PCR)
1198	Tierra	Cmm + (PCR)
1201	Hoja	<i>Alternaria</i> sp. (M)
1202	Hoja	TSWV (I)
1203	Tierra	Bacilos Gram (-) (M)
1205	Tallo	Bacilos Gram (-) (M)
1207	Hoja	<i>Alternaria</i> sp. (M)
1208	Hoja	Bacilos Gram (+) y (-) (M)
1209	Hoja	Bacilos Gram (+) (M)
1210	Hoja	Bacilos Gram (-) (M)
1211	Hoja	Sin crecimiento (M)
1212	Tallo	Cmm + (PCR)
1213	Tallo	Cmm + (PCR)
1214	Hoja	Bacilos Gram (-) (M)
1216	Tallo	Bacilos Gram (+) (M)
1217	Tallo y fruto	Bacilos Gram (+) (M)

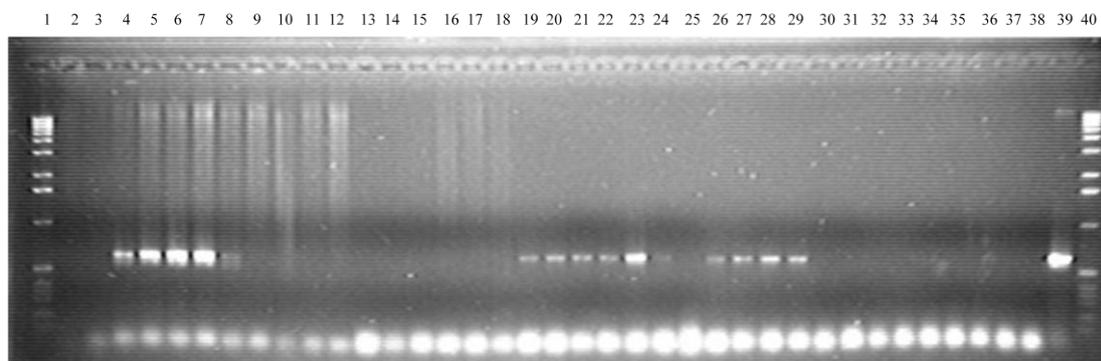


Figura 1. Amplicones detectados por PCR usando oligonucleótidos específicos para *Cmm*. Electroforesis en un gel de agarosa al 2%. La presencia de una banda indica la infección por *Cmm*. En el carril 39 se observa el control (+).

Clonación de genes candidatos. Se logró amplificar el cDNA de los fragmentos de los genes candidatos por PCR (Perox_Secr 75, SCE1 475 y PP2C 75), observando el tamaño de la

banda esperada para cada gen mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 87Volts. También se lograron clonar tanto en TRV como ToMoV (Figuras 2 y 3).

Figura 3

Figura 2

Figura 2. Amplicón de SCE para clonarse en ToMoV y TRV.

Figura 3. Amplicones de PP2C, SCE y Perox para clonarse en ToMoV y TRV.

Se logró obtener tres clonas con inserto de SCE en ToMoV (Figura 4), las cuales serán secuenciadas para confirmar que realmente es el fragmento del gen candidato, y así proceder al bombardeo de plantas resistentes para inducir su silenciamiento y comprobar su participación en la resistencia contra *Cmm*.

Figura 4

Figura 4. Digestión de miniprep de 12 clonas con *EcoR* y *Hind* III de ToMoV_SCE. Clonas 6, 8 y 9 con inserto.

CONCLUSIONES

La detección de patógenos confirmada por métodos moleculares le da certeza al agricultor para un tratamiento adecuado en el control de enfermedades y lograr asegurar una buena cosecha, lo cual implica una reducción en pérdidas de producción. Además conociendo el problema, se pueden aplicar tratamientos alternativos al control químico más amigables con el medioambiente.

El uso de vectores de silenciamiento es una herramienta útil para la detección de genes implicados en los mecanismos de defensa, el clonar SCE1 475 en TRV representa un paso importante para lograr el objetivo, sin embargo aun falta clonar este gen en ToMoV y los genes Perox_Secr 75, y PP2C 75 en ambos vectores de silenciamiento. El desarrollo de estos vectores es un paso esencial para el desarrollo de plantas de jitomates resistentes al cáncer bacteriano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balaji V, Sessa G., “Activation and manipulation of host responses by a Gram-positive Bacterium”, Plant Signaling & Behavior 3:10, 839-841, **2008**.

Ventelon-Debout M, Tranchant-Dubreuil C, Huang T, Bangratz M, Siré C, Delseny M and Brugidou C., “Rice Yellow Mottle Virus stress responsive genes from susceptible and tolerant rice genotypes”, BMC Plant Biology 8:26, **2008**.