

Revista Peruana de Biología

ISSN: 1561-0837

lromeroc@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San  
Marcos  
Perú

Fernandez, Elizabeth; Gutarra, Liliam; Kreuze, Jan  
Evaluación del gen que codifica la enzima BHPMEH para la inhibición de la marchitez  
bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*  
Revista Peruana de Biología, vol. 22, núm. 2, octubre, 2015, pp. 193-198  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195042257006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## TRABAJOS ORIGINALES

### Evaluación del gen que codifica la enzima $\beta$ HPMEH para la inhibición de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*

### Evaluation of the gene encoding the enzyme $\beta$ HPMEH for the bacterial wilt inhibition caused by *Ralstonia solanacearum*

Elizabeth Fernandez\*, Liliam Gutarra y Jan Kreuze

Laboratorio de Bacteriología y Biotecnología Aplicada, Centro Internacional de la Papa, Apartado 1558, Lima 12, Perú.

\*Autor para correspondencia

E-mail Elizabeth Fernandez: [e.fernandez@cgiar.org](mailto:e.fernandez@cgiar.org)

E-mail Liliam Gutarra: [l.gutarra@cgiar.org](mailto:l.gutarra@cgiar.org)

E-mail Jan Kreuze: [j.kreuze@cgiar.org](mailto:j.kreuze@cgiar.org)

#### Resumen

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith es una de las enfermedades bacterianas más importantes que ataca a cultivos agrícolas como papa, tomate, banana, entre otros, causando grandes pérdidas en la producción. Desafortunadamente, su control ha sido difícil por su amplio rango de hospederos alternativos, su supervivencia en el suelo y su variación biológica y genética; así como porque no hay variedades con altos niveles de resistencia y porque no existe un control químico efectivo. Quorum sensing (percepción de quorum) es el fenómeno mediante el cual la acumulación de unas moléculas permite a una bacteria saber el número de bacterias que se encuentran en el medio es decir la densidad poblacional. La bacteria *R. solanacearum* posee un sistema *quorum sensing* para la regulación de la expresión de genes de virulencia, y en la cual la molécula 3-OH-PAME es el autoregulador de esta señal. Se conoce que la molécula BHPMEH hidroliza a 3-OH-PAME, anulando así la señal de autorregulación y por tanto la comunicación *quorum sensing* en *R. solanacearum*. Con el objetivo de evaluar el gen *βhpmeH*, se diseñaron dos vectores que expresen este gen bajo el control de dos diferentes promotores, los cuales fueron verificados por análisis de restricción, secuenciamiento y posteriormente mediante técnicas de agroinfiltración, se observó su expresión y su efecto frente a *R. solanacearum* en hojas de papa de la variedad Desiree. Los resultados de la expresión transitoria, muestran que el gen *βhpmeH* retrasó la aparición de síntomas de la marchitez bacteriana y sería un candidato potencial para transformación genética de la planta entera.

**Palabras clave:** Expresión transitoria; marchitez bacteriana; *quorum sensing*; *Ralstonia solanacearum*; *quorum quenching*.

#### Abstract

*Ralstonia solanacearum* is the causal agent of the devastating bacterial wilt disease that attacks important agricultural crops such as potato, tomato, banana, among others, causing serious yield losses. Control of *R. solanacearum* is difficult because of its wide range of alternate hosts, its long survival in soil, its biological and genetic variation, the lack of natural resistance sources and the insufficiency of the appropriate chemical control measures. *Quorum sensing* is the term that describes the phenomenon whereby the accumulation of molecules allows bacteria to know the number of bacteria found in the environment (population density). *R. solanacearum* has a *quorum sensing* system for the regulation of the expression of virulence genes; the molecule 3-OH-PAME is the self-regulatory signal. The molecule BHPMEH hydrolyzes 3-OH-PAME nullifying the signal of virulence, and thus, the *quorum sensing* communication in *R. solanacearum*. In order to evaluate the *βhpmeH* gene we designed two vectors that express this gene under the control of two different promoters. Both vectors were verified by restriction analysis and sequencing. Agroinfiltration assays were used to analyze gene expression and the effect against *R. solanacearum* in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. The results of the transient expression experiments showed that the expression of gene *βhpmeH* caused a delay in the appearance of symptoms of bacterial wilt and thus is a good candidate for whole genetic plant transformation.

**Keywords:** Transient expression; bacterial wilt; *quorum sensing*; *Ralstonia solanacearum*; *quorum quenching*.

#### Citación:

Fernandez E., L. Gutarra & J. Kreuze. 2015. Evaluación del gen que codifica la enzima  $\beta$ HPMEH para la inhibición de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Revista peruana de biología 22(2): 193 - 198 (Octubre 2015). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i2.11353>

#### Información sobre los autores:

EF, LG, JK: realizaron el diseño experimental; EF, LG, JK: realizaron los experimentos; EF, LG, JK: analizaron los datos; EF, LG, JK: redactó el manuscrito; EF, LG, JK: revisaron y aprobaron el manuscrito.

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

**Presentado:** 09/02/2015

**Aceptado:** 23/04/2015

**Publicado online:** 14/10/2015

#### Fuentes de financiamiento:

**Journal home page:** <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con [editor.revperubiol@gmail.com](mailto:editor.revperubiol@gmail.com).

## Introducción

La marchitez bacteriana causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, es la principal enfermedad bacteriana que limita la producción de papa en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. La enfermedad es causada principalmente por la raza 3, bv 2A, Filotipo II y sequevar 1, adaptada tanto a climas calurosos como fríos (menor a 18 °C); así como a grandes altitudes (mayor a 2500 m). En climas fríos, la bacteria se desarrolla muy lentamente o permanece en estado de latencia dentro de la planta y tubérculos infectados, sin que los síntomas sean notados (Boletín fitosanitario 2006), convirtiéndose en un peligro potencial, porque la semilla de papa infectada constituye el medio principal para la diseminación de *R. solanacearum* cuando los tubérculos infectados con esta bacteria se siembran en lugares cálidos (Aley et al. 1999). Es así, que pueden producirse severos brotes de la enfermedad ocasionando una reducción de hasta el 90% del rendimiento del cultivo y pérdidas en almacenamiento hasta un 98% (SENASA 2005). Además de provocar la pérdida del tubérculo y la planta, la bacteria sobrevive en el suelo, por lo que el campo debe ser abandonado para este cultivo (Borba 2008). Por otro lado, este microorganismo presenta una gran diversidad genética (Yu et al. 2003), un amplio rango de hospederos (Allen et al. 2004), una extensa distribución geográfica y una alta patogenicidad lo cual ha permitido la clasificación de la bacteria en razas y biovars (French 1965), sin embargo un nuevo sistema de clasificación para *R. solanacearum* fue propuesto por Fegan y Prior en el 2005, basado en el análisis de la secuencia espaciadora interna (ITS por sus siglas en inglés) dividiéndolo en cuatro grupos genéticos, o Filotipos, cada uno de los cuales refleja el origen geográfico de la cepa. (Fegan & Prior 2005).

La virulencia y los factores de patogenicidad de *R. solanacearum* son transcripcionalmente controlados por una extensa red de caminos distintos, que interactúan en la vía de transducción de señales. El núcleo de esta red es el sistema sensorial de cinco genes *phc* (phenotype conversion) (Schell 2000). PhcA es el factor central en una compleja cascada de regulación que activa la expresión de numerosos genes que codifican factores de virulencia tales como EPS I y varias exoproteínas, causando marchitez al restringir el flujo de agua a través del xilema y facilitando la invasión y la colonización vascular. *Ralstonia solanacearum* posee un sistema *quorum sensing* para la regulación de la expresión de estos genes de virulencia, siendo la molécula 3-hydroxy-palmitic acid methyl ester (3-OH-PAME) el auto regulador de esta red (Flavier et al. 1997). Esta característica convierte a la molécula 3-OH-PAME, en un potencial blanco para el desarrollo de inhibidores de los factores de virulencia (Shinohara et al. 2007). El sistema de *quorum quenching* (intercepción del quorum) actúa bloqueando distintos pasos implicados en *quorum sensing*, tales como la generación del agente autoinductor, la acumulación del agente señal, o bien la recepción de la señal (Dong et al. 2007). Shinohara et al. (2007) purificaron y caracterizaron la molécula  $\beta$ -Hydroxypalmitate methyl ester hydrolase ( $\beta$ HPMEH), aislada a partir de *Ideonella* sp. La enzima  $\beta$ HPMEH hidroliza a la molécula 3-OH-PAME en 3-OH ácido palmítico y metanol, y anula así la señal *quorum* de *R. solanacearum*. Debido a que se conoce poco acerca del gen  *$\beta$ hpmeh* y la resistencia que potencialmente puede conferir este gen expresado en plantas de papa, el presente trabajo evaluó la expresión del gen  *$\beta$ hpmeh* *in vivo*, cuya enzima del mismo nombre es inhibidora de la señal

*quorum sensing* 3-OH-PAME, señal responsable de la inducción de genes de virulencia en *R. solanacearum*.

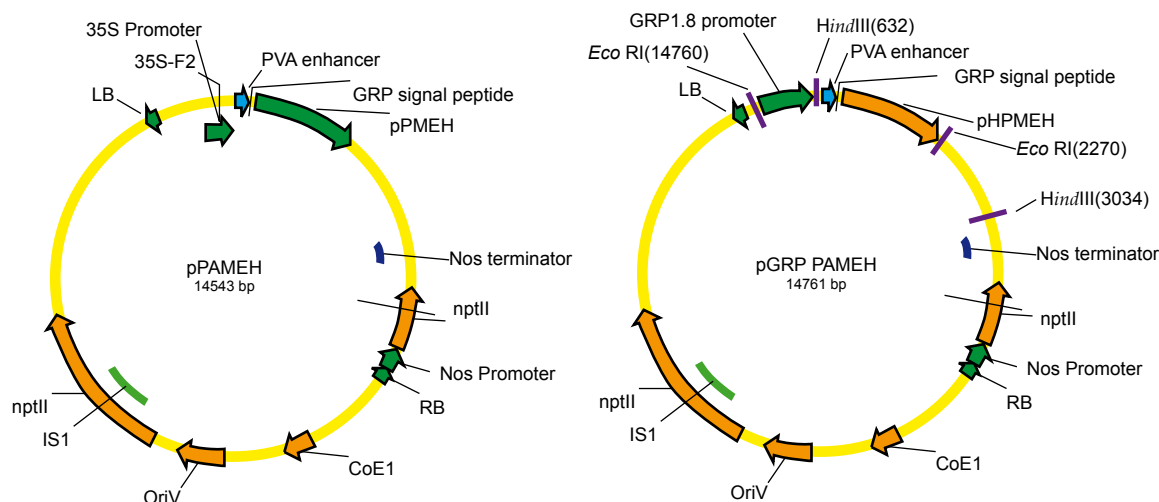
## Materiales y métodos

**Material vegetal.** Las plántulas de papa variedad Desiree fueron obtenidas del banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) (accesión CIP800048). Las plántulas de *Nicotiana benthamiana*, fueron suministradas por el área de virología del CIP para la estandarización de la técnica de agroinfiltración.

**Diseño de plásmidos.** El gen  *$\beta$ hpmeh* y el promotor GRP1.8 fueron sintetizados por la compañía Intelchon (*The Synthetic Genes Company*, Alemania), ambas secuencias fueron clonadas en el sitio de clonamiento múltiple del vector *pENo8H*. El gen  *$\beta$ hpmeh* fue sintetizado basado en codones optimizados para plantas; hacia el extremo 5' del gen se agregaron secuencias reguladoras como la secuencia potenciador PVA 5'UTR que proviene del virus A de papa (PVA por sus siglas en inglés, género *Potyvirus*) la cual potenciará la traducción del gen  *$\beta$ hpmeh*. Adicionalmente en el extremo 5' del gen se agregó la secuencia del péptido señal GRP y que posteriormente dirigirá la proteína hacia el espacio extracelular. El gen optimizado  *$\beta$ hpmeh* se clonó en el sitio *SmaI* del vector *pBIN61* (Bendahmane et al. 2002) el cual contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, género *Caulimovirus*) y el gen *nptII* que codifica para una neomicina fosfotransferasa responsable de la resistencia al antibiótico kanamicina usado como agente de selección, la construcción final se denominó *pPAMEH* (Fig. 1).

Para la construcción del segundo plásmido se removió el promotor 35S del vector *pBIN61* con la enzima *EcoRI*, para clonar en aquel sitio la secuencia híbrida *GRP1.8-PAMEH* obtenida por PCR de extensión por solapamiento, el cual consistió en amplificar independientemente el promotor *GRP1.8* usando los iniciadores *EcoRV-GRP1.8 Fw*: GATATCGCTTCCCTCTTAGG y *GRP1.8 Rv*: GTAGTTTGTTTATTTTATCCCACTTAAAG y el gen optimizado  *$\beta$ hpmeh* usando los iniciadores *GRP1.8\_PVA\_SP\_PAME Fw*: CTTTAAGTGGGATAAAAATAACA-AAC y *EcoRV\_PAME Rv*: GATATCCACCTTATTGGGCG y luego unir las en una segunda reacción de PCR usando los iniciadores *EcoRV-GRP1.8 Fw* y *EcoRV\_PAME Rv* (Sambrook & Russel 2006), a este segundo plásmido se le denominó *pGRP\_PAMEH* (Fig. 1). La verificación del clonamiento y la orientación de los fragmentos se llevó a cabo mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y se usó el secuenciamiento de ADN para comprobar la integridad de las secuencias clonadas.

**Agroinfiltración.** Se sembró *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido *pPAMEH* en caldo Luria Bertani (LB) y se incubó a 28 °C por 2 días. Seguidamente, se inoculó 300  $\mu$ L del cultivo en 50 mL de medio LB suplementado con 5  $\mu$ L de acetosiringona (200 mM) y se incubó toda la noche a 28 °C. Posteriormente, las células fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en solución tampón de agroinfiltración ( $\text{MgCl}_2$  10 mM, acetosiringona 150  $\mu$ M); ajustando la concentración final a una Densidad Óptica (DO) de 0.25 a 620 nm. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 3 horas antes de la infiltración. La infiltración con las suspensiones bacterianas se hizo con la ayuda de una jeringa estéril (sin aguja) y en el envés de toda la hoja.



**Figura 1.** Construcciones genéticas pPAMEH y pGRP\_PAMEH para transformación y expresión del gen  $\beta$ hpmeH en plantas. 35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S; GRP1.8, promotor específico de xilema; PVA enhancer, potenciador de la traducción; GRP signal peptide, señal para exportación de la proteína hacia el espacio extracelular; *nptII* gen neomicina fosfotransferasa II; LR borde derecho; LB, borde izquierdo.

**Infección con *R. solanacearum*.**— La cepa 204 (raza 3 biovar 2A, Filotipo II y sequevar 1) de *R. solanacearum* fue sembrada en medio *Kelman* e incubada a 28 °C por 2 días, al cabo de los cuales se agregó agua destilada estéril y se removió la masa bacteriana con la ayuda de un hisopo estéril. Las células bacterianas fueron resuspendidas en solución tampón de agroinfiltración hasta llegar a una concentración final correspondiente a una DO de 0.1 a 600 nm, que corresponde a  $2 \times 10^8$  UFC por mL. La infiltración en la hoja fue similar a la agroinfiltración con la única diferencia de que sólo se infiltró una porción de la hoja. Las plantas después de la infiltración fueron mantenidas a  $22 \pm 1$  °C y la evaluación se realizó a partir de la aparición de síntomas.

**Determinación de la población de *R. solanacearum*.**— A las 0, 12 y 24 horas post infección de cada tratamiento (Rs control, Agro-pPAMEH+Rs, Agro-pBIN61+Rs, y Agro+Rs) se colectaron dos hojas, tomando un disco de aproximadamente 0.5 cm de diámetro por hoja con un tubo eppendorf de 1.5 mL, usándolo a manera de sacabocado. Se añadió a cada tubo 500  $\mu$ L de agua destilada estéril y se trituró los discos de hoja con un asa de siembra estéril, luego se realizaron cinco diluciones seriadas (1:10). Se sembró en el medio *Kelman* 5  $\mu$ L de cada una de las diluciones por cuadruplicado y se incubó a 28 °C por dos días, al cabo de los cuales se contó el número de colonias y se reportó como unidades formadoras de colonias (UFC).

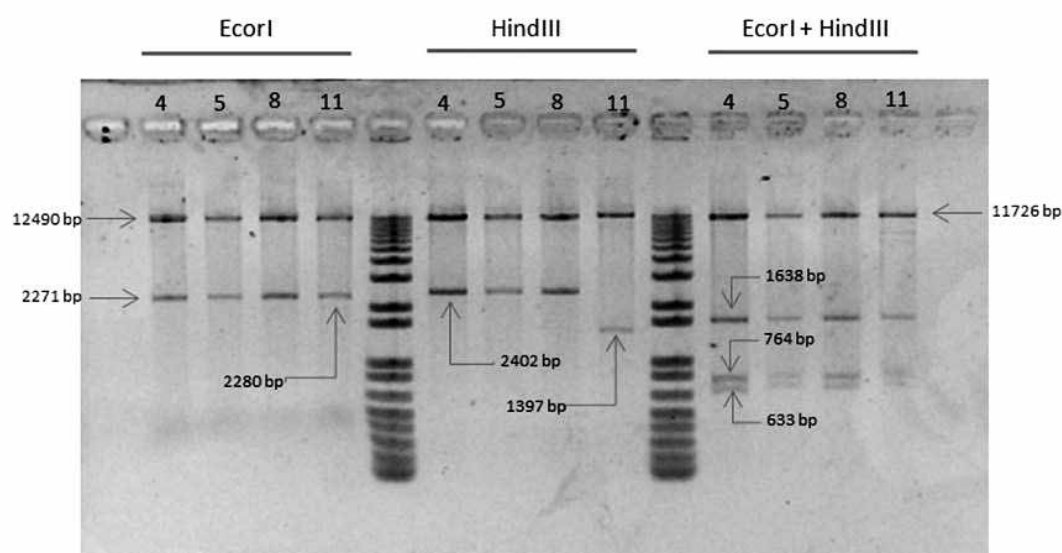
**Aislamiento de ARN.**— El ARN total fue aislado a partir de hojas colectadas al tercer día de la agroinfiltración usando el método de extracción con Trizol (*Reagent-INVITROGEN*) y digiriendo el ADN con DNase TURBO (Ambion). La calidad del ARN extraído fue visualizada bajo luz UV sobre un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium). El ARN aislado fue convertido en ADNc por la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó un RT-PCR para la detección del ARNm del gen  $\beta$ hpmeH, para ello se usaron los iniciadores PAHME Fw: GGGCGAAGTT-GGCAAAATATCC y pameH Rv: GATCAGAGCTACCCAGG-GAAGTG. El volumen final de la reacción de PCR fue de 25  $\mu$ L, conteniendo 25 ng de ADNc, 1X PCR buffer, 0.2  $\mu$ M de cada cebador, 0.2  $\mu$ M dNTPs y 1 U de la enzima GoTaq DNA

polimerasa (Promega). El programa de PCR usado fue: 95 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 30seg, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 15 segundos; y una elongación final de 72 °C por 5 minutos. La amplificación se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems).

**Extracción de proteínas totales.**— Se extrajeron las proteínas totales a partir de hojas de *N. benthamiana* a las 72 h después de la agroinfiltración. Se infiltró las hojas con tampón de extracción (Tris-HCl 0.05, DDT 1 mM, EDTA 1 mM), en seguida las hojas fueron colocadas en una jeringa sin émbolo de 5 mL y esta dentro de un tubo Falcon de polipropileno de 14 mL, luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El líquido intercelular que se colectó en los tubos fue inmediatamente transferido a tubos de 1.5 mL y congelados a  $-20$  °C. Para el análisis de SDS-PAGE se agregó a cada muestra tampón de carga (Glicerol 10%, Tris-HCl 50mM, azul de bromofenol 0.2%, SDS 2%,  $\beta$ -Mercaptoetanol), se hirvieron por 5 minutos y finalmente fueron inmediatamente colocados en hielo para evitar su renaturación. El gel de acrilamida está compuesto de dos sectores: el gel concentrador (4% de acrilamida) y el gel separador (15% de acrilamida). La corrida se realizó entre 60 – 70 Voltios(V) durante dos horas hasta que las muestras se apilaron y llegaron todas al gel separador se subió el voltaje a 100 V y se dejó correr aproximadamente 3 horas, terminada la corrida se realizó la tinción del gel con una solución de azul de coomassie (0.025%).

## Resultados y discusión

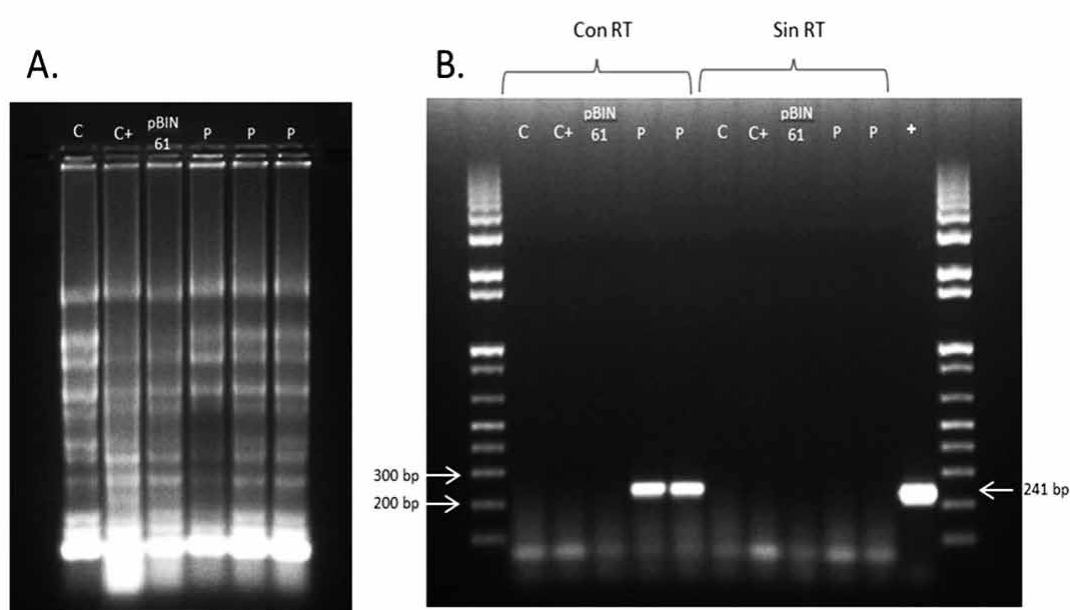
**Verificación de los vectores de transformación.**— La digestión del plásmido pPAMEH con la enzima *HindIII* generó los fragmentos esperados de tamaños 12145 pb y 2398 pb. De igual forma, el plásmido pGRP\_PAMEH generó dos fragmentos de 12359 pb y 2402 pb al ser cortado con la enzima de restricción *HindIII*, mientras que la digestión doble con *EcoRI* y *HindIII* generó 4 fragmentos de restricción de 11726, 1638, 764 y 633 pb (Fig. 2). La integridad de los promotores y la secuencia del gen  $\beta$ hpmeH fueron confirmadas por secuenciación. Las secuencias fueron ensambladas y posteriormente analizadas por un alineamiento local con BLASTX, los resultados del alineamiento muestran que nuestra secuencia peptídica tiene una identidad



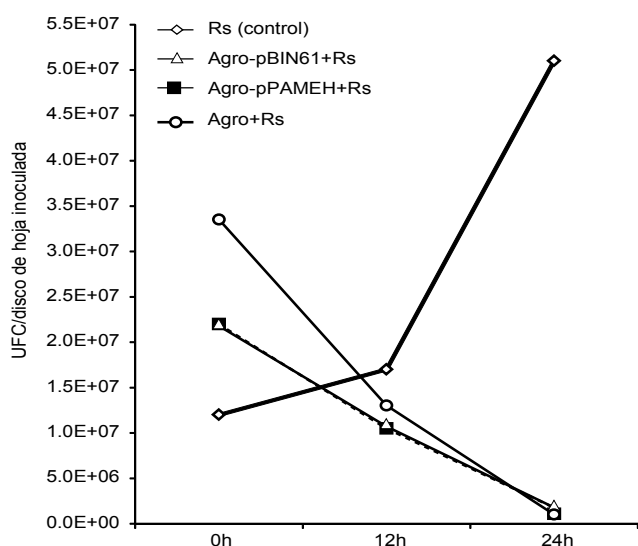
**Figura 2.** Fragmentos de restricción del plásmido pGRP\_PAMEH usando las enzimas *EcoRI* y *HindIII* en digestiones simples y dobles. Marcador, 1Kb plus DNA ladder.

del 99% con respecto a la secuencia de la proteína  $\beta$ H<sub>1</sub>PM<sub>1</sub> de *Ideonella* sp. FERM BP-08660 (accesión: BAF64544.1) esto debido a que nuestra secuencia tiene una sustitución de nucleótido que llevó a la codificación de una Prolina (P) a una Serina (S), sin embargo esta no se situó dentro del sitio activo y por lo tanto puede que no afecte su actividad enzimática (datos no mostrados). Además, se comprobó que la secuencia de la proteína  $\beta$ H<sub>1</sub>PM<sub>1</sub> conserva el motivo consenso G-X-S-X-G entre todas las *serine esterasas* (Brenner 1988, Shinohara et al. 2007) y que el motivo conservado se encuentra ubicado cercano al centro de toda la secuencia proteica. Además ésta es una característica importante en enzimas que poseen motivos conteniendo Serina (Akoh et al. 2004).

**Expresión del gen  $\beta$ h<sub>1</sub>pm<sub>1</sub>.** Se detectó en las muestras infiltradas con *pPAMEH* un transcrito de 241 pb (Fig. 3B). Las hojas infiltradas con el vector *pBIN61* (control negativo) no mostraron ninguna señal. El resultado por lo tanto indicaría que el gen clonado está siendo expresado apropiadamente a nivel transcripcional. No obstante, no se pudo evidenciar expresión a nivel traduccional pues en el SDS-PAGE no se pudo observar claramente un fragmento del peso molecular esperado correspondiente al de la proteína  $\beta$ H<sub>1</sub>PM<sub>1</sub>. Debido al uso de un extracto crudo de proteínas (proteínas totales que se encuentran en la hoja), posiblemente no se pudo diferenciar el péptido esperado debido a la gran cantidad de proteínas extraídas que enmascararon su visualización en el gel, debido



**Figura 3. A,** Calidad de la extracción de ARN total a partir de hojas después de tres días de infiltración. **B,** RT-PCR para confirmar la expresión del ARNm del gen  $\beta$ h<sub>1</sub>pm<sub>1</sub>; C, hojas infiltradas con buffer ; pBIN61, hojas infiltradas con el vector pBIN61, P, hojas infiltradas con el plásmido pPAMEH; +, plásmido pPAMEH; RT, enzima transcriptasa reversa. Marcador, 1Kb plus DNA ladder.



**Figura 4.** Gráfico que muestra el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) en el tiempo a las 0h, 12h y 24h post infección con *R. solanacearum*.

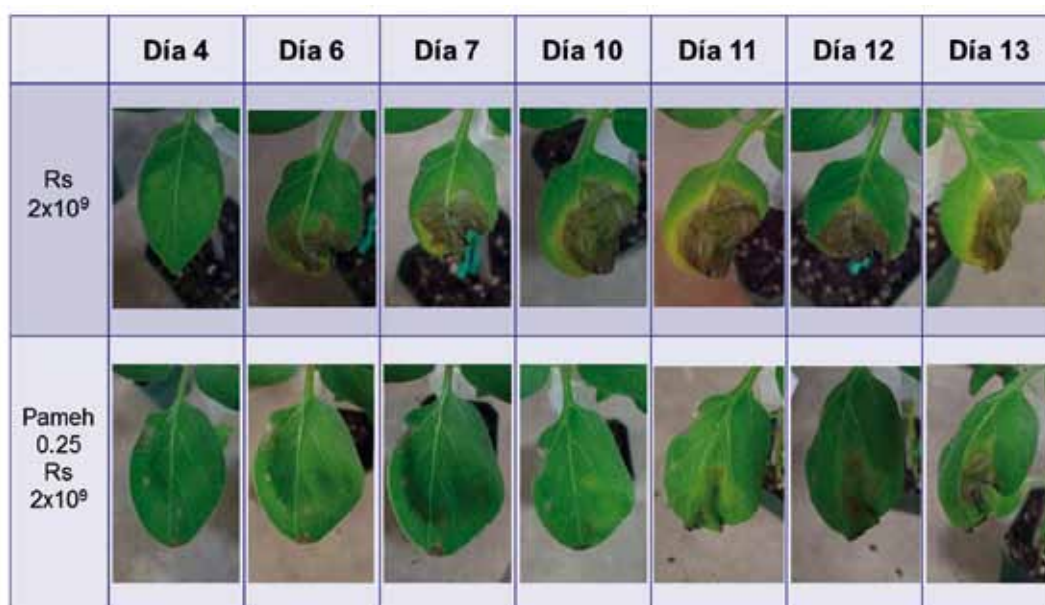
al uso de un crudo de proteínas (proteínas totales que se encuentran en la hoja). Por otra parte, la ausencia de la banda esperada pudo deberse al bajo nivel de expresión del producto final pues expresión transitoria de la proteína cesa al cabo de 2 ó 3 días (Menassa et al. 2012).

**Determinación de la población de *R. solanacearum*.** En la Figura 4 se puede observar que la población de *R. solanacearum* se incrementó en el transcurso del tiempo, sin embargo, no se pudo apreciar si *pPAMEH* tuvo algún efecto en la población de *R. solanacearum* ya que en los tres tratamientos que incluían *Agrobacterium* se apreció una marcada disminución de la población, por lo tanto no se le puede atribuir esta disminución de la población de *R. solanacearum* al gen *βhpmeh*, lo que podría ser un efecto que está ejerciendo la bacteria *A. tumefaciens* sobre la bacteria *R. solanacearum*, probablemente debido a algún tipo

de competencia por espacio y nutrientes o de cierta interacción bacteria-bacteria (Cano 2011).

**Infección con *R. solanacearum*.** En las hojas infiltradas con *Agrobacterium* conteniendo el plásmido *pPAMEH* y que fueron infectadas a los tres días con *R. solanacearum*, se observó un retardo en la aparición de síntomas. La clorosis y la marchitez aparecieron a los 10 y 12 días respectivamente; en cambio, en el control inoculado con *R. solanacearum* éstos síntomas aparecieron a los 4 días y 6 días respectivamente (Fig. 5). Este retraso, de 6 días en la aparición de síntomas de marchitez bacteriana, nos lleva a concluir un cierto nivel de tolerancia conferida por el gen *βhpmeh*, debido a que la acción enzimática de esta proteína interfiere con la comunicación intercelular entre las células de *R. solanacearum*, anulando así la señal de virulencia y evitando por tanto la conversión fenotípica al modo patógeno. Esto explicaría la tardía aparición de los síntomas característicos de la enfermedad. Según los resultados del conteo de las UFC de *R. solanacearum*, el gen por sí solo no afectaría el crecimiento de la población bacteriana, es decir no afectaría directamente a la supervivencia del patógeno (Romero & Otero 2010), pero el gen sí afectaría a la expresión de los factores de virulencia, lo cual concuerda con el retraso de la sintomatología de la marchitez bacteriana hallado en el presente trabajo.

El uso de la estrategia *quorum quenching* ha sido aplicada con éxito por diversos autores para la interferencia de la comunicación bacteriana (Dong & Zhang 2005, Park et al. 2005, Dong et al. 2007, Williams et al. 2007), ésta estrategia tendría cierta ventaja ya que no debería ejercer presión selectiva sobre el patógeno, evitando así la aparición de resistencias (Romero & Otero, 2010). Sin embargo, sería recomendable combinar este mecanismo con otros genes de resistencia que sí afecten el crecimiento de la bacteria, ya que como se demostró en este trabajo el gen *βhpmeh* inhibió parcialmente la patogenicidad, pero no afectó el crecimiento de la bacteria, quedando esta como infección latente en el tejido del hospedero. Por lo tanto, la combinación con genes de resistencia constituiría una estrategia mucho más interesante en el tratamiento de la marchitez



**Figura 5.** Fotos que muestran los resultados de las infecciones con *R. solanacearum* (Rs) en hojas de *Solanum tuberosum* variedad "Desiree" infiltrado previamente con *Agrobacterium* conteniendo el plásmido *pPAMEH*.

bacteriana. Genes como el de la *lactoferrina* que expresado en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) retrasa significativamente los síntomas de *R. solanacearum* e inhiben la multiplicación de la bacteria (Mitra & Zhang 1994, Zhang et al. 1998) podría ser usado como candidato. De igual forma estudios previos demostraron que la proteína ferredoxina incrementa la resistencia a la marchitez bacteriana en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*); y que la población bacteriana fue mucho más baja en los tratamientos con ferredoxina que en los controles (Huang et al. 2007, Lin 2010). Así mismo estudios con el gen *cecropina b* en tomate han mostrado que la expresión de este péptido aumenta la resistencia a la marchitez bacteriana y además inhibe el crecimiento del patógeno *in vitro* (Jan et al. 2010). La expresión del EFR, un receptor de reconocimiento de patrones de patógenos, en plantas de *Nicotiana* (*N. benthamiana*) y tomate igualmente mostraron una reducción drástica de los síntomas de marchitez (Lacombe et al. 2010). Por consiguiente, los resultados demuestran que la actividad *Quorum quenching* de la enzima  $\beta$ HPMEH es una estrategia viable para contrarrestar parcialmente la patogenicidad de *R. solanacearum* y su expresión estable en plantas combinado con otros genes de resistencia ofrecería oportunidades interesantes para el control de la enfermedad.

### Literatura citada

- Aley P., E. Chujoy, E. French, B. Lemaga & S. Priou. 1999. Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa: Guía de diapositivas. Centro Internacional de la Papa. Series de Diapositivas del CIP para Capacitación IV: 3.
- Allen C., P. Prior & A. Hayward. 2004. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum*. Species complex. American Phytopathological Society eds., St. Paul (Minnesota) Pp.29-38.
- Bendahmane A., G. Farnham, P. Moffett & D. Baulcombe. 2002. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. The Plant Journal 32: 195-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2002.01413.x>
- Boletín Fitosanitario. 2006. Podredumbre parda de la patata o marchitez bacteriana (*Ralstonia Solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al). Junta de Castilla y León, Valladolid. Pp.2-7.
- Borba N. 2008. La papa un alimento básico. Posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica. RAP-AL eds. Montevideo, Uruguay. Pp. 1-11.
- Brenner S. 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. Nature 334: 528-530. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/334528a0>
- Cano M. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 14 (2): 15-31.
- Akoh C., L. Guan-Chiun, L. Yen-Chywan, H. Tai-Huang & Jei-Fu. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. Progress in Lipid Research 43(6): 534-552. doi: [doi:10.1016/j.plipres.2004.09.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002)
- Dong Y. & H. Zhang. 2005. Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. Journal of Microbiology 43: 101-109.
- Dong Y., L. Wang, & L. Zhang. 2007. Quorum quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 362: 1201-1211. Doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>
- Fegan M. & Prior P. 2005. How complex is the 'Ralstonia solanacearum' species complex? American Phytopathological Society 449-461.
- Flavier A., S. Clough, M. Schell & T. Denny. 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. Molecular Microbiology 26(2): 251-259. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5661945.x>
- French, E. 2006. Interaction between strains of *Ralstonia solanacearum*, its host and the environment. International Workshop PCARRD. Proceedings The Philippines. Pp. 94-104.
- Jan P., H. Hsu-Yuang & C. Hueih-Min. 2010. Expression of a Synthesized Gene Encoding Cationic Peptide Cecropin B in Transgenic Tomato Plants Protects against Bacterial Diseases. Applied and Environmental Microbiology 76(3):769. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00698-09>
- Huang H., C. Liu, M. Lee, et al. 2007. Resistance enhancement of transgenic tomato to bacterial pathogens by the heterologous expression of sweet pepper ferredoxin-I protein. Phytopathology 97:900-906. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-97-8-0900>
- Lacombe, S., A. Rougon-Cardoso, E. Sherwood, et al. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature Biotechnology. 28: 365-369. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1613>
- Lin Y., H. Hsiang-En, W. Fang-Sheng, et al. 2010. Plant ferredoxin-like protein (PFLP) outside chloroplast in *Arabidopsis* enhances disease resistance against bacterial pathogens. Plant Science 179: 450-458. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.07.006>
- Menassa R., A. Ahmad & J. Joensuu. 2012. Transient expression using Agrobacterium and its applications in molecular farming. Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects, Springer, Netherlands. Pp.183-198. doi: [10.1007/978-94-007-2217-0\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2217-0_9)
- Mitra A. & Z. Zhang. 1994. Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). Plant Physiology. 106:977-981. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.3.977>
- Patron N. 2014. DNA assembly for plant biology: techniques and tools. Current Opinion in Plant Biology 19:14-19. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2014.02.004>
- Park S., H. Kang, O. Jang, et al. 2005. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. Applied and Environmental Microbiology 71: 2632-2641. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.5.2632-2641.2005>
- Romero M. & A. Otero. 2010. Interceptación de señales de comunicación bacteriana en bacterias aisladas del medio marino. Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España) XXIX: 129-206.
- Sambrook J. & D. Russel. 2006. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Eds. New York. Tercera edición. 628 pp.
- Schell M. A. 2000. Control of Virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annual Review of Phytopathology 38:263-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.263>
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2005. (en línea) Marchitez bacteriana de la papa en línea. Peru. [http://www.senasa.gob.pe/sanidad\\_vegetal/programas\\_%20fitosanitarios/cip\\_papa/aspectos\\_generales.html](http://www.senasa.gob.pe/sanidad_vegetal/programas_%20fitosanitarios/cip_papa/aspectos_generales.html)
- Shinohara M., N. Nakajima & Y. Uehara. 2007. Purification and characterization of a novel esterase (b-hydroxypalmitate methyl ester hydrolase) and prevention of the expression of virulence by *Ralstonia solanacearum*. Journal of Applied Microbiology 103: 152-162. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03222.x>
- Williams P., K. Winzer, W. Chan & C. Cámara. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 362: 1119-1134. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2007.2039>
- Yu Q., M. Alvarez, P. Moore, F. Zee, et al. 2003. Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Ginger in Hawaii. Bacteriology, 93 (9): 1124- 1130. doi: [10.1094/PHYTO.2003.93.9.1124](http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.9.1124)
- Zhang Z., D. Coyne, A. Vidaver, & A. Mitra. 1998. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. Phytopathology 88:730-734. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.7.730>