

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) TRANSGÉNICA CON EL RECEPTOR
EFR EN RESPUESTA A MARCHITEZ BACTERIANA CONSIDERANDO ASPECTOS EN
BIOSEGURIDAD**

Por

Federico BOSCHI GONZÁLEZ

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Vegetales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. PhD. Francisco Vilaró, Ing. Agr. Dr. Guillermo Galván, Q.F. PhD. María Inés Siri e Ing. Agr. PhD. Alejandra Ferenczi el 8 de diciembre de 2016. Autor: Ing. Agr. MSc. Federico Boschi. Director: Ing. Agr. Dr. Marco Dalla Rizza.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco a:

A mi tutor Marco Dalla Rizza por la dedicación, trabajo y tiempo en mi formación.

Al Instituto Nacional de Semillas que me permitió desarrollarme personal y profesionalmente y en especial a Gerardo Camps por el apoyo brindado en todo momento. A todos mis compañeros de trabajo fundamentalmente a Mariana, Sebastián, Virginia, Susana, Gustavo, Alejandra, Inés, Melisa y Mariela.

Al INIA que me permitió desarrollar la investigación, a Paco que colabora en todo momento y a todo el equipo de Biotecnología, en especial a Sara, Claudia y Matías.

A la Facultad de Agronomía y en ella a Guillermo Galván; y a la Facultad de Química especialmente a María Inés Siri y Virginia Ferreira.

A Alejandra del MGAP por sus aportes y dedicación al trabajo.

Dedico este trabajo a:

Mi familia, a Lourdes soporte fundamental en mi vida y mis tres hijos Leandro, Gonzalo y Tiziano.

A mis padres Orlanda y Carlos

A mis hermanos que siempre están conmigo Mauricio y Daniela; y a mis sobrinos que iluminan a la familia.

Contenido

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY	VIII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. EL CULTIVO DE PAPA	1
1.2. IMPORTANCIA DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	2
1.3. PERCEPCIÓN DEL PATÓGENO Y RESPUESTAS DE RESISTENCIA.....	4
1.3.1. <i>Inmunidad inducida por PAMP</i>	6
1.3.2. <i>Inmunidad inducida por efectores (ETI)</i>	8
1.4. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD	10
1.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO	10
1.5.1. <i>Mejoramiento genético convencional</i>	10
1.5.2. <i>Desarrollo de organismos vegetales genéticamente modificados</i>	13
1.6. ASPECTOS EN BIOSEGURIDAD.....	14
1.6.1. <i>Marco regulatorio y OGM en Uruguay</i>	15
1.7. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	16
1.8. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE LA TESIS	18
1.8.1. <i>Objetivo general</i>	18
1.8.2. <i>Objetivos específicos</i>	18
1.8.3. <i>Hipótesis de trabajo</i>	18
2. RISK ASSESSMENT OF GENETICALLY MODIFIED POTATO WITH THE EFR GENE FOR BACTERIAL WILT RESISTANCE IN URUGUAY	20
2.1. ABSTRACT	20
2.2. INTRODUCTION.....	21
2.2.1. <i>Biosafety at a regional and global level</i>	21
2.2.2. <i>Regulatory framework and GMOs in Uruguay</i>	23
2.2.3. <i>The INIA-TSL EFR-potato project</i>	26

2.3.	BIOSAFETY STUDY	27
2.3.1.	<i>Characteristics of the species</i>	27
2.3.2.	<i>Features of the genetically modified organisms</i>	29
2.4.	RISK ASSESSMENT	33
2.4.1.	<i>Safety of products for human consumption</i>	33
2.4.2.	<i>Safety of the regulatory elements in the construction and transformation method</i>	34
2.4.3.	<i>Studying the gene flow</i>	36
2.4.4.	<i>Impact on non-target organisms</i>	38
2.4.5.	<i>Study on the possibility of developing weed species</i>	39
2.4.6.	<i>Potential benefits of the potato-EFR crop</i>	40
2.5.	CONCLUSIONS	42
2.6.	REFERENCES	43
3.	ANÁLISIS MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A RALSTONIA	
	SOLANACEARUM DE EVENTOS TRANSGÉNICOS DE PAPA EFR	52
3.1.	RESUMEN	52
3.2.	SUMMARY	53
3.3.	INTRODUCCIÓN	54
3.3.1.	<i>Importancia del cultivo de papa e influencia de R. solanacearum</i>	54
3.3.2.	<i>Percepción del patógeno y respuestas de resistencia</i>	57
3.3.3.	<i>Mejoramiento genético</i>	60
3.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.4.1.	<i>Material vegetal</i>	63
3.4.2.	<i>Presencia del transgén EFR</i>	63
3.4.3.	<i>Número de copias del gen EFR</i>	64
3.4.4.	<i>Expresión proteica</i>	65
3.4.5.	<i>Funcionalidad proteica</i>	66
3.4.6.	<i>Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano</i>	67
3.4.7.	<i>Determinación de la presencia de R. solanacearum en infección latente en tallo</i>	69

3.4.8. Determinación de la presencia de <i>R. solanacearum</i> en infección latente en tubérculo	70
3.5. RESULTADOS	72
3.5.1. Detección del transgén en las líneas de papa-EFR	72
3.5.2. Determinación del número de copias del gen EFR	74
3.5.3. Expresión de la proteína EFR	75
3.5.4. Funcionalidad de la proteína	75
3.5.5. Determinación de resistencia a <i>R. Solanacearum</i>	78
3.5.6. Estudio por tratamiento	79
3.5.7. Detección de <i>R. solanacearum</i> en infección latente en tallo	83
3.5.8. Detección de <i>R. solanacearum</i> en infección latente en tubérculo	84
3.6. DISCUSIÓN	85
3.7. CONCLUSIONES	90
3.8. BIBLIOGRAFÍA	91
4. CONCLUSIONES GENERALES	97
5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	98

EVALUACIÓN DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) TRANSGÉNICA CON EL RECEPTOR EFR EN RESPUESTA A MARCHITEZ BACTERIANA CONSIDERANDO ASPECTOS EN BIOSEGURIDAD

RESUMEN

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* es una de las principales enfermedades del cultivo de papa. Las plantas pueden detectar la presencia de patógenos a través de la percepción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) mediante receptores de reconocimiento (PPR) que desencadenan la Inmunidad Inducida por PAMP (PTI). El receptor EFR es un PPR de *Arabidopsis thaliana*, que confiere resistencia a la planta contra bacterias fitopatógenas. El objetivo de esta tesis fue contribuir al desarrollo de cultivares de papa con resistencia a *R. solanacearum* combinando diferentes estrategias de mejoramiento genético y considerando aspectos en Bioseguridad. Se emplearon 10 eventos transgénicos de INIA Iporá (susceptible) y 10 eventos transgénicos del Clon 09.509,6 (parcialmente resistente) transformados con el receptor EFR. Se realizó la Evaluación de Riesgo Ambiental en Bioseguridad de papa-EFR para describir los elementos que deben ser considerados en el análisis. Los eventos fueron caracterizados molecularmente determinando el número de copias, la presencia y funcionalidad de la proteína EFR. Los 10 genotipos de INIA Iporá-EFR presentaron el gen y expresaron la proteína funcional, mientras que el número de copias varió de uno a cuatro. Para el clon 09509,6-EFR, siete eventos presentaron el gen EFR y cinco expresaron la proteína funcional, mientras que el número de copias varió de 0 a 12. Se estudió la respuesta de la planta a la inoculación con *R. solanacearum*, observándose en los genotipos 34, 37, 38, 39 y 41 del clon 09509.6-EFR un alto grado de resistencia. En los genotipos de Iporá-EFR 3 y 27 no se detectó la bacteria en tallo ni en tubérculo. El gen EFR genera respuesta adicional a la resistencia obtenida por mejoramiento genético convencional.

Palabras clave: OGM, *Ralstonia solanacearum*, mejoramiento genético, Bioseguridad.

EVALUATION OF PAPA (*Solanum tuberosum* L.) TRANSGENIC WITH EFR RECEPTOR IN RESPONSE TO BACTERIAL WILT CONSIDERING ASPECTS IN BIOSECURITY

SUMMARY

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the major diseases of potato cultivation. Plants can detect highly conserved pathogen associated molecular patterns (PAMP) through pattern recognition receptor (PRR), starting a PAMP triggered immunity (PTI). In particular, EFR receptor is a PRR from *Arabidopsis thaliana*, which confers resistance to plants against a range of phytopathogenic bacteria throw. The objective of this thesis was to contribute to the development of potato varieties with resistance to *R. solanacearum* combining strategies of genetic improvement considering aspects in Biosafety. Ten transgenic events of INIA Iporá (susceptible) and 10 transgenic events of Clone 09509.6 (partially resistant) were used with the EFR receptor. The Environmental Risk Assessment in potato-EFR biosecurity was performed to describe the elements that should be considered in the analysis. The events were molecularly characterized by determining the number of copies, the presence and functionality of the EFR protein. The 10 genotypes of INIA Iporá-EFR presented the gene and expressed functional protein, while the number of copies varied from one to four. For Clone 09509.6-EFR, seven events presented the EFR gene and five expressed the functional protein, while the number of copies ranged from 0 to 12. The plant response to *R. solanacearum* inoculation was studied and observed a high degree of resistance was observed in genotypes 34, 37, 38, 39 and 41 of the Clone 09509.6-EFR and the genotypes of INIA Iporá-EFR 3 and 27 in which the bacteria in stem and tuber were not detected. These results indicate that the EFR gene generates additional response to the resistance obtained by conventional genetic improvement.

Key words: GM, *Ralstonia solanacearum*, plant breeder, Biosafety.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. EL CULTIVO DE PAPA

La papa (*Solanum tuberosum* L.) está entre los cuatro cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial, conjuntamente con el arroz, trigo y maíz (FAO, 2012). Tiene una producción aproximada de 300 millones de toneladas por año (Centro Internacional de la papa, CIP 2011), en aproximadamente 150 países situados entre las latitudes 65 N y 50 S y hasta altitudes de 4000 metros sobre el nivel del mar (Bradshaw et al., 2006). La producción a nivel mundial crece a mayores tasas que otros cultivos importantes (CIP, 2011).

Su baja tasa de multiplicación, problemas en la comercialización y promoción, explican que el recambio varietal sea muy lento, y por ejemplo, dos de los cultivares más plantados en el mundo -Russett Burbank y Bintje- fueron desarrollados hace más de 100 años (Vilaró et al., 2000).

En Uruguay se plantan alrededor de 5000 ha por año de papa, principalmente en dos ciclos de cultivos (otoño y primavera) (MGAP-DIEA, 2013). El 95 % de la semilla utilizada para la producción pertenece a cultivares desarrollados por programas de mejoramiento genético del extranjero (Rodríguez y Hirczak, 2016) y presentan ciertas restricciones sanitarias. En la región existen programas de mejora genética orientados a reducir estas restricciones con germoplasma adaptado a las condiciones locales (Vilaró et al., 2000).

Los programas de mejoramiento genético a nivel mundial han buscado desarrollar cultivares con el objetivo de mejorar las características culinarias y organolépticas, la adaptación a determinados sistemas de producción, los parámetros agronómicos y la resistencia a enfermedades y plagas (Vilaró et al., 2000). Adicionalmente, es muy difícil desarrollar cultivares que presenten resistencia a enfermedades y principalmente de origen bacteriano. En la actualidad no existe un cultivar comercial de papa caracterizado como resistente a la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) (CIP, 2011).

El programa de mejoramiento genético de papa del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) comenzó a fines de la década del 70, con el objetivo de levantar restricciones varietales que presentaban los cultivares extranjeros; inicialmente entre otras

características se enfatizó dentro de los objetivos de selección la resistencia a enfermedades provocada por virus liberándose el cultivar INIA Iporá en 1996 (Vilaró et al., 2000).

1.2. IMPORTANCIA DE *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum es una bacteria gram negativa patógena y agente causal de la marchitez bacteriana, una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial. Este patógeno abarca un amplio rango de hospederos (más de 200 especies de diversas familias) y ataca un gran número de cultivos de importancia económica entre ellos la papa, banano, morrón, tomate y especies forestales. Está reportado en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Hayward, 1991).

En el cultivo de papa, la marchitez bacteriana afecta más de 80 países en un área aproximada de 1,5 millones de ha, es la segunda enfermedad del cultivo y la primera en importancia de origen bacteriano. En regiones donde el potencial de producción está limitado por agentes bióticos, es la principal causante de las pérdidas de cultivo, lo que ocurre en África y en algunas zonas de Asia. De hecho, está estimado que ocasiona un daño económico anual de 950 millones de dólares (Walker y Collion, 1998; Champoiseau et al., 2009; Muthoni et al., 2013).

R. solanacearum libera exopolisacáridos que se acumulan en los vasos xilemáticos del tallo de la planta. Por tal motivo, el principal síntoma de la enfermedad es el marchitamiento generalizado provocado por la falta de agua. También produce daños a nivel de follaje y tubérculos, lo cual ocasiona daños sobre la producción disminuyendo rendimientos y sobre la calidad del producto (Genin, 2010). A nivel de tubérculo se puede presentar en forma asintomática y es factor de descarte en el comercio internacional por ser considerado patógeno cuarentenario afectando tanto la papa-semilla como la papa-consumo.

Es uno de los principales patógenos de suelo en la agricultura y debe ser capaz de resistir en las condiciones ambientales de la rizósfera. Los factores que influyen en la sobrevivencia son la humedad, temperatura y el contenido de materia orgánica del suelo (Coutinho, 2005, Hayward, 1991). Además, puede causar infecciones latentes en malezas o plantas hospederas y así sobrevivir en sitios protegidos ciclo tras ciclo (Coutinho, 2005).

El inóculo inicial de la enfermedad se encuentra en el tubérculo semilla de papa o en el suelo. Cuando la enfermedad comienza en el tubérculo semilla el patógeno se traslada desde el tubérculo madre al resto de la planta. Con el propósito de disminuir la fuente de inóculo inicial en la semilla, el uso de semilla certificada es fundamental ya que cuenta con análisis sanitario de laboratorio (INASE, 2015a). Cuando la enfermedad se da a partir del suelo generalmente la infección ingresa a nivel radicular por raíces secundarias o por heridas causadas en el manejo (Genin, 2010).

El principal efecto negativo es que después que ingresa el patógeno al suelo del cultivo puede permanecer durante largos períodos de años, mediante formas de resistencia o asociado a especies malezas o silvestres hospederas, restos vegetales y cursos de agua, por lo tanto ese campo productivamente queda inapropiado para futuros cultivos de papa, ocasionando un daño actual en el cultivo presente y un daño a futuro restringiendo las opciones productivas (Wenneker et al., 1999; Hayward, 1991).

En el Uruguay se han caracterizado más de 20 cepas que afectan al cultivo de papa, que en su totalidad pertenecen al Filotipo II secuevar 1 (raza 3 biovar 2A). Esta baja diversidad se corresponde con la adaptación ambiental de clima templado reportado para este grupo de cepas (Galván et al., 2006; Siri et al., 2009).

La marchitez bacteriana es una enfermedad ocasional, que no se da siempre en el cultivo de papa del Uruguay, pero si las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables y la fuente de inóculo está presente puede llegar a pérdidas productivas y económicas muy importantes. En la encuesta realizada en el 2002 por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) (DIEA-MGAP, 2003), el 34 % del área en producción de papa presentó problemas con esta enfermedad, en el 80 % de los casos se registró en cultivos sembrados con semilla nacional, habiendo productores afectados en todos los estratos de tamaño.

La búsqueda de resistencia a marchitez bacteriana comenzó en la década de 1960 en USA (Schmiediche, 1988). En Uruguay comenzó con la incorporación al germoplasma de la especie *Solanum commersonii* Dun. (cmm) a fines del siglo XX y principios de la década del 2000 con fuentes de resistencia en trabajos reportados por Laferriere et al. (1999) y Galván et al. (2006).

1.3. PERCEPCIÓN DEL PATÓGENO Y RESPUESTAS DE RESISTENCIA

En forma general, las plantas son resistentes a la mayoría de los microorganismos incluidos los fitopatógenos, comportamiento denominado como “resistencia de la especie no hospedera”, pues se considera que no tiene interacción el microorganismo con la planta. La protección en el vegetal está dada generalmente por mecanismos pasivos, como las capas cuticulares, cera preformadas, metabolitos secundarios antimicrobianos y respuestas inducidas como el engrosamiento de las paredes celulares, formación de papilas y la muerte celular programada (Jones y Dangl, 2006).

Los microbios asociados al vegetal pueden ser patógenos que deterioran el crecimiento vegetal y la reproducción. Las plantas tienen dos mecanismos de reconocimiento de patógenos que le permiten responder a la infección. El primero reconoce moléculas comunes a muchas clases de microbios, incluidos los no patógenos, denominada la Inmunidad Inducida por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) conocida por su sigla en Inglés PTI (*PAMP Triggered Immunity*). En la co-evolución de las interacciones hospedero-microbio, los patógenos han adquirido la capacidad de suministrar proteínas efectoras a la célula vegetal para suprimir la PTI y volverse nuevamente virulentos (Jones y Dangl, 2006).

A su vez, las plantas generaron factores para interaccionar con dichas proteínas efectoras, proteínas de resistencia (R) o vigilancia para controlar ya sea directamente o indirectamente la presencia de las proteínas efectoras del patógeno. Esta resistencia se denomina Inmunidad Inducida por Efectores (ETI, *Effectors Triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006).

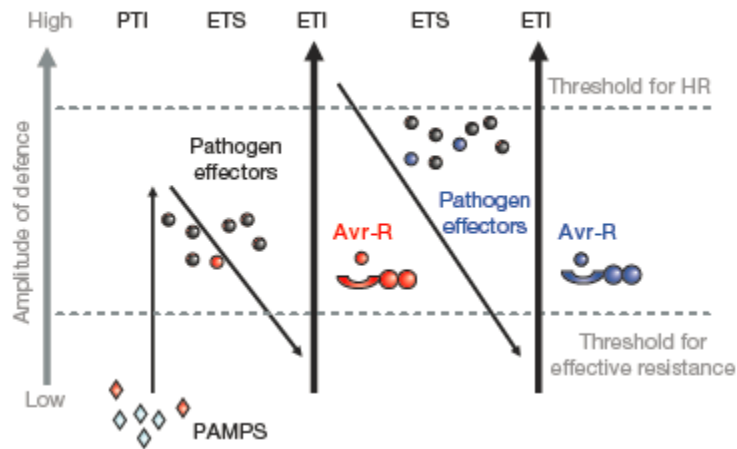


Figura 1. Modelo de zigzag ilustra la respuesta del sistema inmune de la planta (Jones y Dangl, 2006).

Como se observa en la Figura 1, en la fase 1, las plantas detectan PAMP o mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR, Pattern Recognition Receptors) para activar la inmunidad inducida por PAMP (PTI). En la fase 2, los patógenos exitosos presentan la capacidad de liberar efectores que interfieren con la PTI, o de otra manera permiten la nutrición y la dispersión de patógenos en el vegetal, lo que resulta en la susceptibilidad activada por efectores (Effector Triggered Susceptibility, ETS) (Jones y Dangl, 2006).

En la fase 3, un efector es reconocido por una proteína NB-LRR, tipo R, lo cual desencadena la inmunidad inducida por efectores (ETI). Es una respuesta similar a PTI pero más amplificadas que puede inducir la muerte celular por respuesta hipersensible (HR). En la fase 4, puede ser que el patógeno haya perdido el efector o tal vez adquirido nuevos efectores a través de flujo horizontal de genes y estos pueden ayudar a los agentes patógenos para reprimir ETI, por lo tanto, se da la enfermedad (Jones y Dangl, 2006).

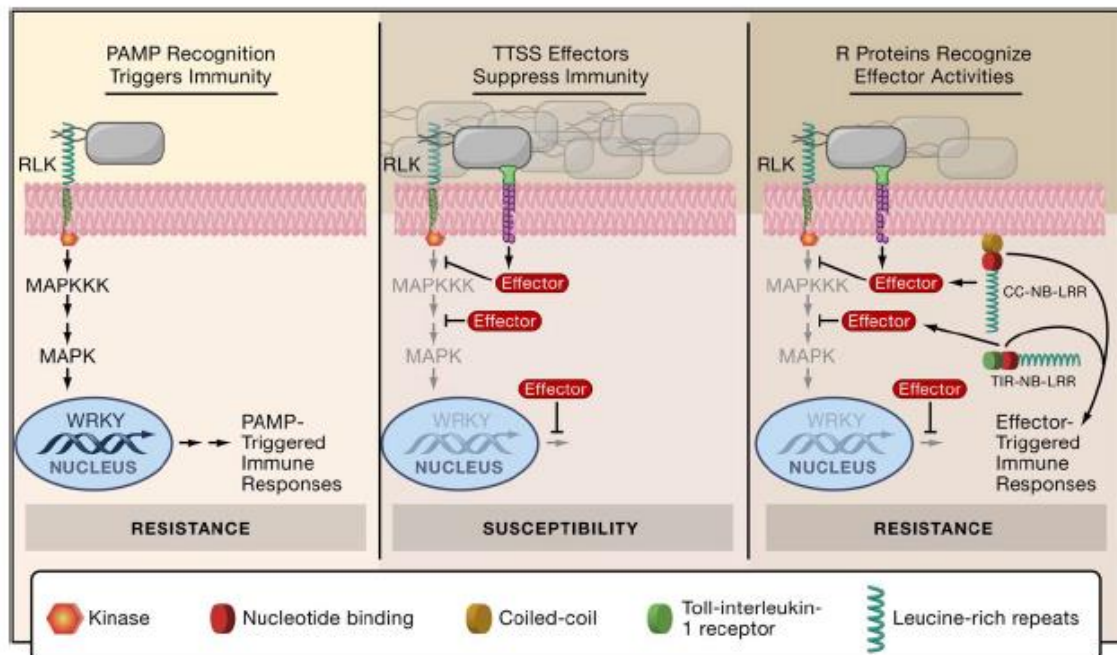


Figura 2. Modelo de la evolución de la resistencia bacteriana en plantas (Chisholm et al., 2006).

En la Figura 2 se ilustra que ante la presencia de un patógeno se produce el reconocimiento vegetal del PAMP bacteriano activando así una reacción en cadena de MAP quinasas (MAPK) y la reprogramación transcripcional mediada por factores de transcripción WRKY de la planta para generar una respuesta inmune contra el patógeno (resistencia).

Chisholm *et al* (2006) detallaron que las bacterias patógenas gram negativas utilizan el sistema de secreción de tipo III, para inyectar proteínas efectoras directamente en el interior de las células del hospedero con el fin de suprimir la respuesta PTI, permitiendo la invasión y acumulación de bacterias en el apoplasto de la planta. Son las Proteínas R de la planta las que reconocen la actividad de estas proteínas efectoras y restauran la resistencia a través de las respuestas ETI.

1.3.1. Inmunidad inducida por PAMP

Los PAMP son estructuras muy conservadas presentes en los microorganismos, tienen la característica fundamental de que son indispensables para la vida del patógeno y no están

presentes en el hospedero, lo cual permite reconocerlos como extrañas y desarrollar los mecanismos de defensa de la planta (Zipfel et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, la PTI es la primera línea de defensa que posee la planta ante la presencia de un agente patogénico. Los receptores de reconocimiento de patrones son proteínas que tienen la capacidad de desencadenar las respuestas de defensa de las plantas. Entre los PAMP descritos de reconocimiento en plantas cabe destacar que la flagelina bacteriana es reconocida a través de un dominio rico en leucina (LRR) del receptor FLS2, mientras que en vertebrados es reconocido por el receptor de tipo toll TLR5. Estos dos receptores reconocen zonas altamente conservadas pero en diferentes regiones de la flagelina, lo que indica que en los animales y en las plantas han evolucionado los sistemas de percepción a la flagelina de forma independiente (Boller y Felix, 2009).

El receptor FLS2 de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) tiene la capacidad de reconocer una zona N terminal muy conservada (flg22) de la flagelina (Felix et al. 1999). Por otra parte, el receptor de reconocimiento de PAMP (PRR) denominado *Elongation Factor Receptor* (EFR) de *A. thaliana* ha sido descrito en especies de las familias de crucíferas y reconoce el factor de elongación Tu (Elongation Factor Tu, EF-Tu) (Kunze et al., 2004). Los factores de elongación forman parte del mecanismo de síntesis de nuevas proteínas por traducción en el ribosoma, y por lo tanto, son moléculas muy abundantes y estables, no modificables fácilmente por el organismo. El péptido elf18 es la zona acetilada N-terminal conservada del EF-Tu que reconoce el receptor EFR (Zipfel et al., 2006).

El factor de elongación EF-Tu está involucrado en la traducción de proteínas e interactúa con el citoesqueleto celular y mantiene la forma celular. Por ende, esto demuestra que es una molécula fundamental para la vida y el desarrollo celular y no puede ser fácilmente reemplazada o eliminada por mutación en el patógeno (Defeu Soufo et al., 2010).

La activación de MAP quinasas es un evento muy temprano en la señalización de las plantas cuando se enfrentan con diferentes microorganismos, lo que contribuye a una mayor eficacia en las respuestas de defensa (Nakagami et al., 2005). Se ha demostrado que el epítipo flg22 activa como respuesta de defensa una cascada de MAP quinasa (MPKs), incluyendo MEKK1, MKK4 / 5, y MPK3 / 6 (Asai et al., 2002; Nu Hse et al., 2000). Estas MPKs son probablemente parte del estrés en la señalización activada por otros PAMP, tales como quitina y por otras condiciones de estrés bióticos o abióticos (Nu Hse et al., 2000; Nakagami et al.,

2005). La activación de la quinasa parece indicar que elf18 y flg22 inducen las mismas actividades. Por lo tanto, la señalización inducida por los dos PAMP parece converger antes de la activación de estas quinasas (Zipfel et al., 2006).

Una vez activos, los receptores PRR desencadenan: a) alteraciones en la pared celular, b) flujo de iones H^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, lo que involucra el ingreso de calcio al citoplasma celular, c) la acumulación de quitinasas, glucanasas y proteasas, proteínas relacionadas a la defensa, que detienen el proceso de colonización del patógeno, y d) fundamentalmente desarrollan un rápido aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), esto es de notoria importancia en la respuesta de defensa vegetal por su acción antibiótica (Boller y Felix, 2009).

Los eventos de defensa que se dan posteriormente involucran la biosíntesis de etileno, cambios en los patrones de expresión génica, deposición de calosa y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis PR y fitoalexinas entre otras (Boller y Felix, 2009).

1.3.2. Inmunidad inducida por efectores (ETI)

En la interacción y evolución conjunta planta patógeno los microorganismos han tenido la capacidad de desarrollar mecanismos para evadir o suprimir la defensa basal activada en primera instancia (PTI). Para que esto resulte, los patógenos debieron modificar la estructura de las moléculas que son reconocidas por las plantas y así estos perdieron la capacidad de reconocimiento.

Los PAMP son estructuras altamente conservadas y cumplen una función determinante en la vida del patógeno, pero a través de la evolución conjunta planta patógeno ciertas excepciones se han reportado en estas moléculas, como algunas variantes en la flagelina o modificaciones post-traduccionales que evitan el reconocimiento por parte de los PRR de la planta (Abramovitch et al. 2006).

La PTI compone un aspecto muy importante de la resistencia no hospedero, lo que explicaría por qué la mayoría de las plantas son resistentes a la mayoría de los patógenos, por lo tanto, la modificación de los PAMP sería muy poco probable si no han evolucionado el hospedero y patógeno en forma conjunta (Lacombe et al. 2010).

A modo de ejemplo, las bacterias gram negativas desarrollaron un mecanismo altamente especializado en el cual inyectan sus efectores dentro de la células del hospedero, mediante el sistema de secreción del tipo III (T3SS). Estos efectores presentan la capacidad de inducir la respuesta de hipersensibilidad en el hospedero (HR) lo que lleva a la ganancia de avirulencia en el patógeno (Mudgett, 2005). Esto está dado cuando alguna de estas proteínas efectoras son reconocidas por proteínas R (de resistencia) de la planta y desencadena la inmunidad inducida por efectores (ETI), los demás mecanismos de resistencia activados por el ETI son similares a los de PTI pero con mayor intensidad (Jones y Dangl, 2006).

Las bacterias fitopatógenas pueden secretar aproximadamente 20 a 30 efectores durante la infección (Chang et al. 2005). La actividad de los efectores de patogenicidad y el T3SS es esencial para la multiplicación bacteriana y el desarrollo de síntomas de la enfermedad (Staskawicz et al., 2001).

Los efectores tienen la capacidad de alterar la fisiología vegetal en los genotipos susceptibles para sostener el crecimiento del patógeno. Estas proteínas efectoras fúngicas o bacterianas que se secretan a las plantas pueden poseer actividad enzimática que son responsables de incrementar la virulencia del patógeno y evitar su detección. Por ejemplo, algunos de los efectores más estudiados son *AvrPto*, *AvrRpt2* y *AvrRpm1* de *Pseudomonas syringae* que inhiben las respuestas de defensa provocados por el reconocimiento de PAMP (Hauck et al., 2003; Kim et al., 2005).

Algunos trabajos han reafirmado la hipótesis de que los efectores bacterianos secretados por el sistema T3SS pueden tener un papel crucial en la supresión de las respuestas de defensa PTI, haciendo susceptible a la planta frente a determinadas infecciones. A su vez, estos efectores expresados por los genes *avr* de avirulencia en un patógeno específico pueden ser detectados por las proteínas R en un cultivar específico, que resultan en una interacción compatible (Chisholm et al., 2006). Esto es lo que se denomina en la teoría de Flor como la interacción gen por gen o resistencia de genes mayores que generalmente son utilizadas en los programas de mejoramiento genéticos de cultivares (Lacombe et al., 2010).

1.4. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

El marchitamiento bacteriano de la papa o *Bacterial wilt* como es conocido internacionalmente (BW) es una de las enfermedades más difíciles de controlar debido a la falta de tratamientos curativos, la gran diversidad genética del patógeno, la capacidad de sobrevivencia a distintas condiciones climáticas, los diversos mecanismos de diseminación, persistencia y patogenicidad (Saddler, 2005).

Otro aspecto importante es la falta de resistencia genética estable en cultivares comerciales provocado por dos aspectos relevantes: 1) la baja disponibilidad de germoplasma con resistencia a esta enfermedad en los programas de mejoramiento y 2) la baja adopción de cultivares que tienen los agricultores lo que explica que el recambio varietal en esta especie sea considerado lento (Vilaró et al., 2000).

El control de BW no es curativo sino que la estrategia es preventiva y está basada en la precaución del ingreso de la fuente de inóculo al sistema productivo. Esto se logra al utilizar semilla certificada en zonas de producción con suelo sin inóculo, manejo del cultivo y de su logística, variedades de ciclo corto y un adecuado manejo del agua y drenaje (Gepp, 2012).

Dada la baja efectividad en el control de la enfermedad en el manejo del cultivo y teniendo en cuenta consideraciones agroecológicas, los esfuerzos están dirigidos hacia el mejoramiento genético. Desde hace más de 40 años se han buscado fuentes de resistencia en especies cercanas a *Solanum tuberosum* L. (*S. tuberosum*), como por ejemplo *S. phureja*, *S. chacoense*, *S. raphanifolium*, *S. sparsipilum* y *S. multidissectum* en distintos programas de mejoramiento (González, 2010)

1.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO

1.5.1. Mejoramiento genético convencional

El fitomejoramiento comprende alterar o modificar las características heredables de las plantas para obtener cultivares (variedades o híbridos) mejorados genéticamente, adaptados a condiciones específicas, de mayores rendimientos económicos y de mejor calidad productiva. El mejoramiento genético convencional consta de la hibridación y selección en sucesivas

instancias con el propósito de obtener los resultados antes mencionados (Vilaró et al., 2000). Los objetivos en programas de mejoramiento tienen variados requerimientos comerciales que abarcan aspectos de mercado (color de piel, profundidad de los 'ojos', forma), destino final (fresco o industrial), rendimiento, ciclo, resistencia a plagas y enfermedades. Debido a los frecuentes cambios en estos requerimientos de mediano y largo plazo, los mejoradores se apoyan en especies salvajes y cultivares comerciales para alcanzar los objetivos que se resumen cuando se crea una variedad (Dalla Rizza et al., 2006).

Los programas de mejoramiento genético para obtener cultivares con resistencia a *R. solanacearum* datan de principios de la década del 60. A principios de los 2000 se obtuvieron materiales genéticos avanzados con resistencia de campo al marchitamiento causado por la raza 3 más la raza 1 y con calidad de tubérculo aceptable (Priou et al., 2005). Actualmente no existe en el Registro Nacional de Cultivares de Uruguay un cultivar que presente resistencia a este patógeno (INASE, 2016).

INIA en colaboración con la Facultad de Agronomía y la Facultad de Química comenzaron a trabajar a principios de los 2000 en la incorporación al banco de germoplasma de papa genotipos con resistencia a *R. solanacearum* provenientes de especies emparentadas como *S. commersonii* y se realizaron los primeros cruzamientos para introducir en *S. tuberosum* esta resistencia (González, 2010; Narancio et al., 2013).

S. commersonii Dun. es una especie silvestre diploide ($2n=2x=24$; 1 EBN), originaria del sur de América del Sur y se encuentra presente en Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay (Hawkes, 1994). Ésta ha sido destacada por su potencialidad para el mejoramiento genético de papa como aporte de resistencia a enfermedades de virus, hongos y principalmente a *R. solanacearum*, además de resistencia a estrés abiótico como el frío y sequía (Carputo et al., 2007; Galván et al., 2006).

Los trabajos realizados por Galván et al. (2006) y Siri et al. (2009) reportaron que *cmm* presenta resistencia a *R. solanacearum* y se caracterizaron 30 genotipos para la cepa de la raza 3 biovar 2 en el Uruguay.

El éxito de los cruzamientos entre las especies del género *Solanum* cuando no intervienen barreras pre-cigóticas, se caracteriza mediante un valor al endosperma de cada especie que se le denomina el Número de Balance del Endosperma (EBN) y puede ser 1, 2 o 4 (Johnston et al. 1980; Johnston y Hanneman, 1982).

Las especies del género *Solanum* que se pueden cruzar deben tener un EBN similar para obtener progenie viable. Una de las limitaciones del uso de cmm en el mejoramiento genético de *S. tuberosum* es la barrera a la hibridación post-cigótica entre las especies, cmm ($2n=2x=24$, 1 EBN) y *S. tuberosum* ($2n=4x=48$, 4EBN) (González et al., 2013).

Para introducir la resistencia de cmm en *S. tuberosum* fue necesario realizar un cruzamiento puente con *Solanum phureja* que presenta 2EBN y puede cruzarse con cmm y a su vez con *S. tuberosum*. Por ende, los genes que participan de la resistencia en cmm fueron transferidos en el cruzamiento con *S. phureja* y este híbrido fue cruzado con *S. tuberosum* para introducirlos en la especie (Figura 3) (González et al., 2013).

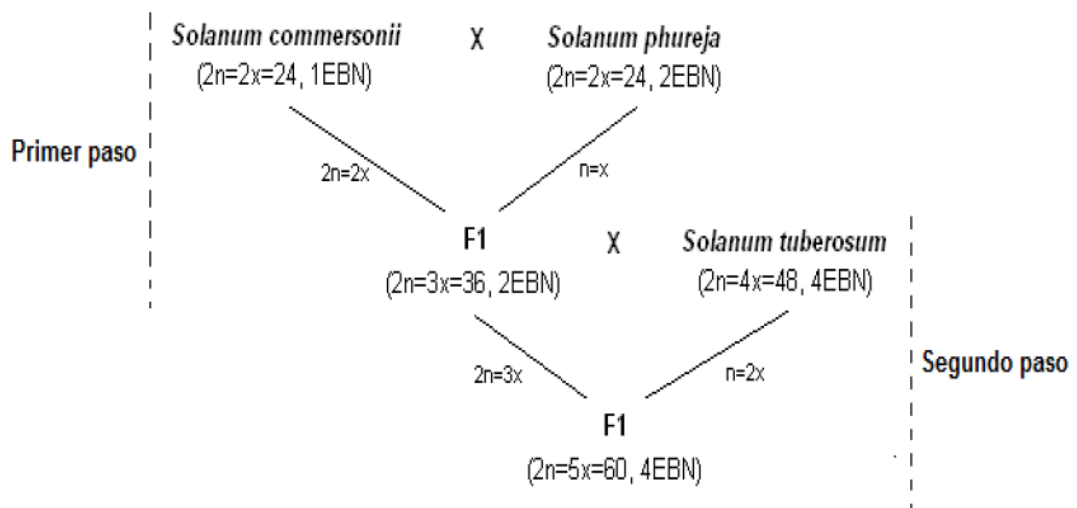


Figura 3. Esquema de cruzamientos utilizados para la introgresión de genes de resistencia de cmm a *S. tuberosum*. El primer paso es realizar el híbrido entre cmm y *S. phureja* y el segundo paso es realizar el cruzamiento entre dicho híbrido y *S. tuberosum* (tomado de González, 2010)

El INIA cuenta con clones avanzados de *S. tuberosum* en etapa de mejoramiento que presentan resistencia parcial a *R. solanacearum*. Estos clones se continúan cruzando con genotipos 4x (*S. tuberosum*) con el propósito de combinar la fuente de resistencia con cultivares con otras características de interés agronómico. Estos genotipos se encuentran en estudio y presentan un alto valor para el mejoramiento genético de papa en el Uruguay. Sin embargo,

pese a los esfuerzos realizados y a la investigación desarrollada aún no se ha registrado ningún cultivar con estas características (González, 2010).

1.5.2. Desarrollo de organismos vegetales genéticamente modificados

Los Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OGM) son plantas provenientes del mejoramiento genético obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética para la transferencia de genes que pueden estar en combinación con otras estrategias y técnicas de fitomejoramiento (FAO, 2001).

La ingeniería genética y del desarrollo de OGM es una herramienta que se puede utilizar dentro del programa de mejoramiento genético de una especie, con el principal cometido de utilizar genes que se encuentran más alejados evolutivamente de la especie de interés. Por lo tanto, se puede ampliar el rango de genes disponibles en el mejoramiento genético (Dalla Rizza, 2015).

Los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) comenzaron a implementarse en la década del 80. A partir de la década del 90 se liberaron al mercado los primeros cultivos transgénicos en soja, maíz y algodón. Las principales características introducidas en los cultivos fueron la tolerancia a herbicidas y la resistencia a insectos (MGAP, 2015).

El desarrollo y uso de OGM a nivel mundial han tenido un impacto en el beneficio de la producción para el agricultor del 68.2 %, basado principalmente en el aumento del rendimiento de los cultivos (21.6 %), la disminución del costo de los agroquímicos y la disminución en el uso de los agroquímicos, 39.2 % y 36.9 % respectivamente. Esto ha llevado a un aumento en la investigación más detallada de estas técnicas para colaborar en el mejoramiento genético (Klumper y Qaim, 2014).

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) causa agalla de la corona en muchas especies de plantas mediante un proceso de infección, basado en la transferencia e integración de una parte de su ADN en el genoma de su especie hospedera (Escobar y Dandekar, 2003). Esta propiedad ha sido ampliamente utilizada para introducir genes de interés en plantas, hongos y células humanas (Gelvin, 2003).

Este tema ha llevado a una amplia investigación sobre los procesos en los cuales *Agrobacterium* transfiere su T-ADN y la expresión génica en sus células huésped. La ingeniería

genética tomó gran relevancia en el mejoramiento genético vegetal a partir de este descubrimiento y la manipulación de esta técnica (Gelvin, 2003).

1.6. ASPECTOS EN BIOSEGURIDAD

La Bioseguridad ha sido definida como un conjunto de acciones dirigidas a prevenir, minimizar y eliminar los riesgos asociados a la investigación y desarrollo de organismos genéticamente modificados (OGM), con los objetivos de proteger la salud humana y animal y la preservación del medio ambiente (Ferreira et al. 2012).

En otras definiciones de bioseguridad se contempla la inocuidad de los alimentos, la zoonosis, la introducción de plagas y enfermedades de los animales y las plantas, la introducción de especies exóticas y liberación de OGM y sus derivados. Esta definición está orientada principalmente al análisis de riesgos para prevenir, combatir y/o gestionar las posibles consecuencias negativas para el medio ambiente y para la salud de las personas, animales y plantas (FAO, 2007).

La evaluación del riesgo ambiental (ERA) comprende la identificación de riesgos significativos para el ambiente, la estimación de la probabilidad de que el daño suceda y la propuesta de medidas para reducir el nivel de incidencia de posibles efectos (Wolt et al. 2010). La evaluación de riesgo es el principal estudio realizado por los sistemas regulatorios para la liberación de los OGM al medio ambiente (EFSA, 2006; Wolt et al. 2010).

Para determinar los riesgos de mayor relevancia asociados a los cultivos de OGM se realiza la formulación del problema (FP), donde se señalan todos los elementos, aspectos y características en forma entendible y precisa que construyen el primer paso en la ERA. La FP se basa de los principios establecidos en los convenios internacionales, como el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología y las normas Fitosanitarias de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). Una inadecuada FP puede comprometer al sistema regulatorio, aumentar la incertidumbre, ocasionar mayor preocupación sobre el impacto ambiental y retrasar la toma de decisiones. Esto es debido a que se solicita más información, se exigen medidas desproporcionadas para la mitigación del riesgo y hay falta de comunicación de los resultados sobre el impacto (Johnson et al. 2007; Gray, 2012).

La FP puede ser desarrollada, operativamente, como una secuencia de preguntas que el evaluador de riesgos debe responder: (1) ¿Qué es lo que no queremos ver perjudicado y debemos proteger? (2) ¿Podemos imaginar una forma en la que podría verse perjudicado? (3) ¿Qué posibles daños se pueden ocasionar? y (4) ¿Es relevante? ¿Cuál es el contexto normativo? Existen cuestiones de base socio-política y de análisis científicos con evidencia técnica (Gray, 2102).

A nivel mundial los sistemas regulatorios tienden a disminuir el riesgo en la adopción de la biotecnología y además, a contener un marco de seguridad para el agroecosistema, la salud humana y animal en la producción a mediana o gran escala del cultivo. Estos sistemas regulatorios que tienen como objetivo incrementar y fomentar la transparencia y la participación del público, no deberían favorecer ni dificultar la adopción de dicha tecnología (CONABIA, 2016).

El marco normativo sobre transgénicos, en los distintos países, está basado en dos sistemas regulatorios contrapuestos descritos por Drezner (2007) y Pellegrini (2013): 1) el “GMO-friendly” desarrollado en Estados Unidos, y 2) el principio de precaución y “resistencia” a los transgénicos en la Unión Europea.

1.6.1. Marco regulatorio y OGM en Uruguay

En 2008 Uruguay aprobó el Decreto No. 353/008 que reglamenta el sistema regulatorio actualmente vigente para los vegetales genéticamente modificados. Además, se creó el Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio) integrado por seis ministros (MGAP, MEF, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, Ministerio de Salud Pública, Ministerio de Industria, Energía y Minería y Ministerio de Relaciones Exteriores) (Uruguay, 2008).

En este ámbito, conjuntamente con la decisión política, se creó 1) el equipo técnico-político con el Comité de Gestión de Riesgo (CGR) integrado por seis representantes de los ministerios del GNBio y 2) el sector técnico con la conformación de la Evaluación de Riesgo en Bioseguridad (ERB), el Comité de Articulación Interinstitucional (CAI) y los grupos de trabajo *Ad hoc* para la evaluación de solicitudes (caracterización e identificación molecular, flujo de genes, impacto sobre organismos no blanco e impacto en salud humana) (Uruguay, 2008).

En el Uruguay se pueden autorizar eventos transgénicos que fueron desarrollados y estudiados en otros países con destino a: 1) comercialización 2) evaluación nacional de cultivares, 3) producción de semillas para exportación y 4) investigación nacional. Hasta 2015 se han aprobado con esta normativa 14 eventos transgénicos para comercializar en el país de soja y maíz. Además, se han autorizado para Evaluación Nacional de Cultivares, Investigación y Producción de Semillas para Exportar unos 26 eventos transgénicos, de los cuales alguno se repite el destino al cual fue solicitado el uso (MGAP-GNBIO, 2015).

INIA presentó ante la CGR la solicitud para trabajar con papa-EFR, la cual resultó ser la primera autorización otorgada para manipular un OGM desarrollado por una institución local (MGAP-GNBIO, 2015). El Gabinete Nacional de Bioseguridad en setiembre de 2014 aprobó la resolución N° 65, que estableció las condiciones con las cuales las instituciones deben trabajar en laboratorio o invernáculo al momento de manipular o desarrollar un OGM. A través de la misma, se designa a la CGR para crear un registro de instituciones que manipulen o desarrollen OGM a nivel de laboratorio o invernáculo. Las instituciones a su vez se invitan a registrarse, a contar con una Comisión Interna de Bioseguridad y desarrollar un Manual de Procedimientos que dé cumplimiento al Protocolo de Bioseguridad establecido para la manipulación y desarrollo de OGM en laboratorio o invernáculo. Esto le permitió a INIA realizar los estudios en bioseguridad de los nuevos OGM en el país (Uruguay, 2014).

1.7. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La importancia del cultivo de papa para la alimentación mundial, el sector productivo y los agricultores ha llevado a buscar cultivares con mayores potenciales de rendimiento, calidad de producto y resistencia a enfermedades. La incidencia de enfermedades causadas por bacterias principalmente *R. solanacearum* provoca pérdidas económicas y sociales muy importantes, sobre todo en países donde el cultivo de papa está limitado por factores bióticos, lo cual ha incentivado el mejoramiento genético con este objetivo.

El aumento de la población y por lo tanto el aumento en la demanda de alimentos, la disminución de la superficie productiva per-cápita, la resistencia al uso de agroquímicos por la contaminación en el ambiente y perjuicios hacia la salud humana, tanto los agricultores como los consumidores de alimentos han llevado a la necesidad de optimizar la eficiencia productiva,

con mayores rendimientos por unidad de superficie, de forma inocua y con el mínimo impacto en el ecosistema.

A partir de los avances en el mejoramiento genético con el propósito de explorar fuentes de resistencia a enfermedades bacterianas, INIA ha trabajado en la incorporación en su germoplasma básico de mejoramiento la resistencia proveniente de especies locales como cmm. En este contexto, la ingeniería genética surge como una herramienta complementaria para aportar fuentes de resistencia alternativas que no se encuentran en especies emparentadas a la papa cultivada (*S. tuberosum*). La ingeniería genética permite sumar a los programas de mejoramiento genético fuentes de resistencia de especies, géneros o reinos que no están directamente emparentadas con el cultivo de interés para mejorar. Por lo tanto, abre el espectro de posibilidades para que el investigador utilice genes de interés sin importar las barreras de cruzamiento sexual entre las especies.

En Uruguay no se ha desarrollado ningún evento OGM que esté actualmente de forma comercial, por lo tanto, no existe experiencia en desarrollar la Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) en Bioseguridad para ningún transgénico generado a nivel nacional. Esto ha llevado a proponer en este trabajo una estrategia de ERA para OGM desarrollados y evaluados en condiciones controladas de mejoramiento genético.

En este contexto, trabajos previos han desarrollado conocimiento e información sobre genotipos provenientes del programa de mejoramiento con aceptables niveles resistencia a *R. solanacearum*. La fuente de resistencia proviene de especies emparentadas aunque no se ha logrado ningún cultivar comercial con alto grado de resistencia a esta enfermedad bacteriana.

Generar conocimiento en ingeniería genética para potenciar las fuentes de resistencia obtenidas por mejoramiento genético convencional, es fundamental para complementar herramientas en los programas de mejoramiento genético, con el objetivo de crear alternativas con las fuentes alélicas disponibles que pueden utilizarse para lograr los cometidos del programa.

El desarrollo de genotipos con resistencia a *R. solanacearum* en cultivares con gran adaptación productiva en las condiciones de manejo del cultivo a nivel nacional, es importante para acelerar la adopción varietal por parte de los agricultores nacionales y a su vez tiene el potencial de ser evaluado en otras regiones fuera del país donde la incidencia de la enfermedad

es mayor. En este sentido, tiene el valor de contar con germoplasma en base tetraploide 4x para otros programas de mejoramiento a nivel mundial.

La posibilidad de integrar otra fuente de resistencia, en las líneas avanzadas en el programa de mejoramiento genético con base genética de especies emparentadas, es importante para complementar las alternativas de resistencia a *R. solanacearum* con las que podría contar un futuro cultivar utilizado por los agricultores.

El desarrollo de OGM a nivel nacional es una innovación dado que no hay experiencias en la producción de cultivares con esta tecnologías. Por lo tanto, genera aprendizaje a los investigadores e instituciones involucradas en la formulación y generación de respuestas para futuros desarrollos a nivel nacional.

1.8. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE LA TESIS

1.8.1. Objetivo general

Contribuir al desarrollo de cultivares de papa con resistencia a *R. solanacearum* combinando estrategias de mejoramiento genético de acuerdo al Sistema Regulatorio Nacional en Bioseguridad

1.8.2. Objetivos específicos

- 1) Realizar la evaluación de riesgo de la papa transformada genéticamente con el gen EFR y ajustar el protocolo de Bioseguridad.
- 2) Caracterizar molecular y bioquímicamente los genotipos EFR: detección del número de copias del transgén, expresión de la proteína y funcionalidad proteica.
- 3) Evaluar e identificar genotipos de papa-EFR con resistencia a *R. solanacearum*.

1.8.3. Hipótesis de trabajo

- 1) El riesgo ambiental y humano de utilizar papa modificada genéticamente con el gen EFR es muy bajo o nulo.

- 2) Los genotipos de papa-EFR transformados por *A. tumefaciens* presentan el inserto.
- 3) Los genotipos de papa-EFR expresan la proteína EFR.
- 4) La proteína EFR es funcional en los genotipos de papa-EFR.
- 5) Los genotipos de papa-EFR presentan resistencia a *R. solanacearum*.
- 6) El receptor EFR desencadena la respuesta de PTI en papa y genera resistencia adicional a *R. solanacearum*.

2. RISK ASSESSMENT OF GENETICALLY MODIFIED POTATO WITH THE EFR GENE FOR BACTERIAL WILT RESISTANCE IN URUGUAY

Boschi Federico¹, Vilaró Francisco², Murchio Sara², Smoker Matthew³, Stransfeld Lena³, Schvartzman Claudia², Horvath Diana⁴, Zipfel Cyril³ and Dalla Rizza Marco².

¹ National Seed Institute. Cultivar Evaluation and Registry. Barros Blancos. Uruguay.

² National Institute for Agricultural Research. INIA Las Brujas, R 48 Km 10 Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay.

³ The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

⁴ 2Blades Foundation

Shortened title: **Biosafety of genetically modified EFR-potatoes**

2.1. ABSTRACT¹

Bacterial Wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is the main bacterial disease in potato crops (*Solanum tuberosum*), worldwide there is any variety resistant to this pathogen. The potato breeding program at INIA Uruguay is evaluating the *EFR* gene obtained from *Arabidopsis thaliana* for the development of bacterial-wilt resistant genotypes. The cultivar INIA Iporá (susceptible), and the breeding clone 09509.6 partial resistant against bacterial wilt introgressed from the wild species *S. commersonii*, were genetically engineered with the *EFR* gene, at The Sainsbury Laboratory. The *EFR* cell surface immune receptor is unique to the *Brassicaceae* family; it has the ability to recognize the presence of most bacteria and activate the defense mechanism of the plant. The Problem Formulation methodology was applied to identify relevant risk scenarios that should be evaluated. In Uruguay, two native wild species related to cultivated potatoes (*S. chacoense* and *S. commersonii*) are widely spread. Both species have crossing incompatibility with *S. tuberosum*, thus the occurrence of natural hybridization would be very rare. Besides, although natural crossbreeding with other cultivated potato varieties would happen, volunteer plants generally do not survive outside of cultivation settings. In the end,

¹ Artículo elaborado y enviado a Transgenic Research ISSN: 1573-9368
http://www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/11248?detailsPage=pltc_i_1060879

potato and *Solanum* species would be sharing EFR, a gene that is shortly distant in evolutionary terms; that would confer a bacterial defense attribute without releasing any toxins into the environment. In conclusion, the potential risk to the environment and human health derived from the use of EFR potatoes as GMO would be reasonably similar to the risk entailed by other breeding systems already used in potato cultivation.

Key words: Biosafety Risk Assessment, GMO, potato, disease resistance.

2.2. INTRODUCTION

2.2.1. Biosafety at a regional and global level

The Rio de Janeiro “Earth Summit” was the cradle of the Convention on Biological Diversity, which considered the need for a protocol to establish the appropriate procedures for the transfer, handling and use of living genetically modified organisms (LGMOs). These LGMOs should result from modern biotechnology and therefore, they could have adverse effects on the preservation and sustainable use of biological diversity, and should especially address any risks to human health (UN 1992).

In the Convention on Biological Diversity developed based on the Cartagena Protocol on Biotechnology Safety, Biosafety was agreed as the result of a number of international conventions dealing with the environment and its preservation (Cartagena Protocol 2000).

Biosafety has been defined as a set of actions geared to prevent, minimize and eliminate risks associated with research and to developing genetically modified organisms (GMOs), with the aim of protecting human and animal health and preserving the environment (Ferreira et al. 2012).

Other definitions of biosafety contemplate food safety, zoonoses, the introduction of pests and diseases that attack animals and plants, the introduction of exotic species and the release of GMOs and derived products. This definition is mainly oriented to risk analysis to prevent, combat and/or manage the impact potentially negative for the environment and the health of people, animals and plants (FAO 2007).

The environmental risk assessment (ERA) includes the identification of significant risks to the environment, estimating the odds for the real occurrence of damage and the measures proposed to reduce the incidence of those potential effects (Wolt et al. 2010). Risk assessment is the main study conducted by the regulatory systems for the release of GMOs into the environment (EFSA 2006; Wolt et al. 2010).

A problem formulation (PF) is used to determine the most relevant risks associated with GMO crops. This PF provides a precise and user-friendly list of all the elements, aspects and features to be included in the first step of the ERA. The PF is based on the principles set out in international conventions, such as the Cartagena Protocol on the Safety of Biotechnology and the Phytosanitary Standards of the International Plant Protection Convention (IPPC). An inadequate PF may compromise the regulatory system, increase uncertainty, raise concern about the environmental impact and delay decision-making. All that is due to the fact that they request more information and requires disproportionate measures for the mitigation of risk, added to the fact that the results of the impact are not reported (Johnson et al. 2007; Gray 2012).

Operationally, the PF can be developed as a sequence of questions that the risk assessor must answer: (1) what we do not want to be harmed and we must protect? (2) Can we imagine that it could somehow be adversely affected? (3) Which possible harm could result? and (4) Is it relevant? What is the regulatory context? There are socio-political issues and issues related with the scientific analysis with technical evidence (Gray 2012).

The main concern about GM crops is the possibility that the plant may become a weed, the risk that may arise with the gene flow with wild and cultivated relatives, the plant's potential to negatively impact non-target organisms, and possible adverse effects on biodiversity (Gray 2012).

The concern of the ERA reflects local values derived from the environmental policy, the protection goals and the methodology used for assessment (Suter 2000). It also describes specific details of the transgenic crop and reference information on the relative risk that can be attributed to a specific change. This includes the collection of information available about the biology of the organism to be modified, its nature and the environment where it is likely to be released. The issues analyzed include, for example, the presence of sexually compatible

relatives, farming practices, the presence of protected areas or species and climate (Wolt et al. 2010).

The challenge consists of identifying observable properties to: (1) select scenarios of relevant risk (endpoints for assessment) based on the environmental policy objectives, and define what we want to protect; (2) postulate the hypothesis of a reasonable exposure that could cause environmental damage as a result of activity with or the use of a GMO plant or its processed form, and (3) identify the scenarios that warrant a detailed risk characterization. The standard for any ERA should focus on the reasonable risk to support an effective and efficient decision-making process (Wolt et al. 2010; Gray 2012).

Worldwide, the regulatory systems aim to increase and promote transparency and public engagement, and they should not either favor or hinder the adoption of such technology (CONABIA 2016).

The regulatory framework on GMOs in various countries is based on two conflicting regulatory systems as reported by Drezner (2007) and Pellegrini (2013): 1) the “GMO-friendly” regulatory framework developed in the United States, and 2) the principle of caution and “resistance” against GMOs applied in the European Union.

2.2.2. Regulatory framework and GMOs in Uruguay

The first GM crop to receive marketing authorization in Uruguay was the soybean event 40-3-2, commercially known as RR (Round-up Ready), tolerant to the herbicide glyphosate. The authorization was issued by the General Directorate of Agricultural Services (DGSA²) of the Ministry of Agriculture and Fisheries (MGAP³) in 1996. The DGSA received technical advice of the Advisory Committee for Risk Analysis (CAAR⁴), which has representatives of MGAP’s Agricultural Protection Directorate, the MGAP’s Seed Directorate and the National Institute for Agricultural Research (INIA⁵) (Uruguay 1996a; Ferenczi 2013). In addition, authorization was given to conduct field experiments with seven transgenic events with maize and two with eucalyptus (Uruguay 1996b; Ferenczi 2013).

² Dirección General de Servicios Agrícolas

³ Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca

⁴ Comité Asesor para el Análisis de Riesgo

⁵ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Before defining the best regulatory system for the country, Uruguay gave a moratorium on the authorization of new GM events between 2007 and 2008. In 2008 Uruguay passed Decree No. 353/008, which sets out the current regulatory system. In addition, the National Biosafety Cabinet (GNBio⁶) created in 2008 included six ministries [MGAP, MEF, Ministry of Housing, Land Management and Environment (MVOTMA⁷), the Ministry of Health (MSP⁸), the Ministry of Industry, Energy and Mining (MIEM⁹) and the Ministry of Foreign Affairs (MRREE¹⁰)].

In this area, the political decision led to the joint work of: 1) the technical and political team, with the Committee on Risk Management (CGR¹¹) composed of six representatives from the ministries of the GNBio Cabinet; and 2) the technical sector, with the creation of the Biosafety Risk Evaluation (ERB¹²), the Interagency Coordination Committee (CAI¹³) and the *Ad hoc* working groups for the evaluation of applications (characterization and molecular identification, gene flow, impact on non-target organisms and impact on human health) (Uruguay 2008).

According to Uruguayan law, when discussing the clearance of GMO events, authorities consider whether they were developed and studied in other countries for: 1) marketing 2) value for cultivation and use (VCU), 3) seed production for export and 4) national research. As of 2015, as many as 14 soy and corn transgenic events were approved with this regulation in the country. In addition, about 26 transgenic events have been authorized for VCU, Research, and Seed Production for Export; in some cases, the purpose for which the authorization was requested was repeated (MGAP-GNBio 2015).

⁶ Gabinete Nacional de Bioseguridad

⁷ Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

⁸ Ministerio de Salud Pública

⁹ Ministerio de Industria, Energía y Minería

¹⁰ Ministerio de Relaciones Exteriores

¹¹ Comité de Gestión de Riesgo

¹² Evaluación de Riesgo en Bioseguridad

¹³ Comité de Articulación Interinstitucional

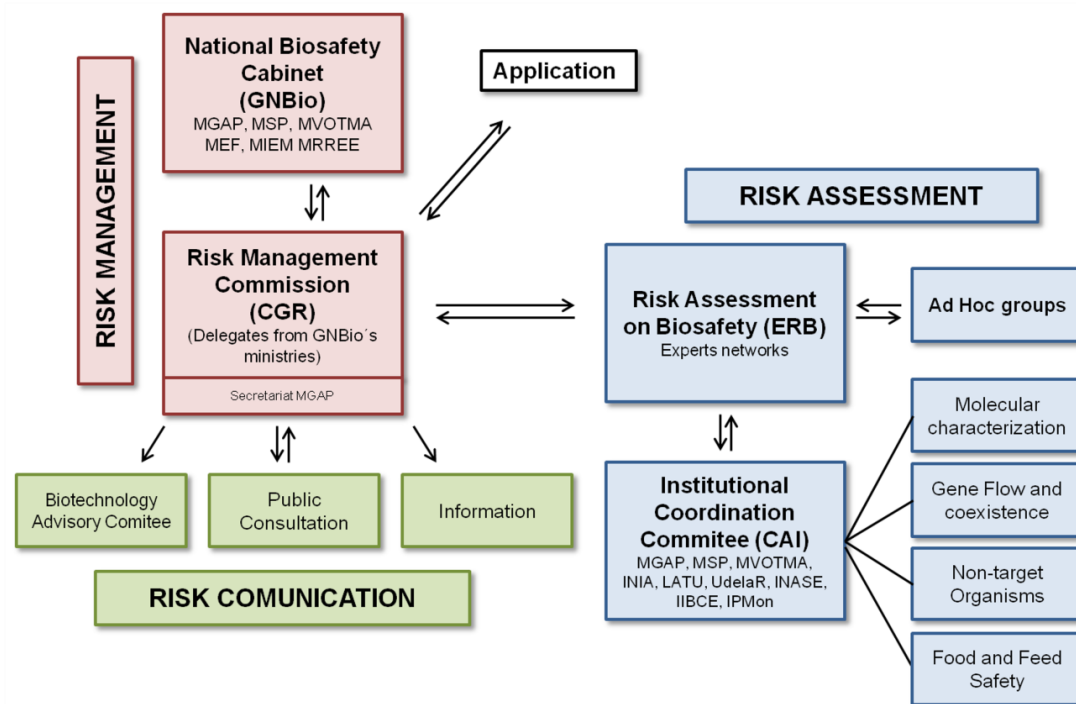


Figure 1. Flow chart of the Uruguayan regulatory system, a network of interdisciplinary Commissions comprising risk management, assessment and communication (Ferenczi 2013).

The first GMOs authorized for marketing in Uruguay and the region were obtained through the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated techniques or biobalistics. These techniques are being superseded by others that improve the random insertion into the genome of interest, the genomic expression environment, the copy number of the gene, simplifying the selection process (Woodfield and White 1996; Qayyum Rao et al. 2009). 'Conventional' techniques leave traces in the transformation that can be detected with simple analysis in specialized laboratories (Gelvin 2003).

Today, there are three methodologies that co-exist to obtain new cultivars: 1) classical breeding, 2) conventional GMOs, and 3) new plant breeding techniques (NPBTs). Many authors report various techniques, such as: agroinfiltration, cisgenesis, grafting on genetically modified rootstock, early induction of flowering, intragenesis, oligonucleotide-directed mutagenesis, gene editing and reverse improvement (Hartung and Schiemann 2014).

The regulatory system established Biosafety measures consistent with the level of risk of contamination or leakage of the genetic transformation. Risk analysis is a study to control

situations in the populations or ecological systems that might be exposed to danger. It is a methodology for characterizing, managing and communicating risk, used by public policy decision makers. The risk characterization is expressed as a defined damage and the odds of its occurrence (exposure), i.e., $\text{risk} = \text{hazard} \times \text{exposure}$ (Nickson 2008). However, risk assessment is more focused on the assessment of the consequences of damage, instead of determining the exposure (Raybould 2010).

The basic levels of contingency (genetically modified organisms or human, animal or plant quarantine pathogens) differ depending on the activities that need to be implemented to effectively and efficiently protect human health and the environment. These risk classes are defined in the European Directive 98/81/EC on the contained use of GMOs and microorganisms (Bury and Dekeyser 2004).

The purpose of containment is to prevent the transfer of recombinant DNA from GMOs out of the system. Depending on the biological characteristics of the genetically modified plant and the agro-ecological system where the greenhouse/laboratory is located, different containment activities are described, and four plant biosafety levels were established (Traynor et al. 2001).

2.2.3. The INIA-TSL EFR-potato project

The Uruguayan National Institute for Agricultural Research (INIA) began to work in the field through an agreement signed with The Sainsbury Laboratory in England in 2012; the project seeks to develop transgenic potato events, in order to incorporate resistance to bacterial wilt. The *EFR* gene encodes for a cell surface immune receptor from *Arabidopsis thaliana*, which has the ability to detect the presence of bacterial pathogens and trigger the defense response of the plant (Zipfel et al. 2006; Lacombe et al. 2010).

INIA submitted a request to the CGR, to work with transgenic potato expressing *EFR*, which turned out to be the first authorization granted to manipulate a GMO developed by a local institution (MGAP-GNBio 2015). In September 2014, the National Biosafety Cabinet adopted Resolution No. 65, which established the working conditions for institutions that manipulate or develop new GMOs. The CGR is designated to create a directory of institutions that handle or develop GMOs. The institutions in turn are required to register and to have an Internal Biosafety

Commission and develop a working procedure. This has enabled INIA to perform biosafety studies of new GMOs in the country (Uruguay 2014).

The aim of this paper is to analyze the elements for the assessment of risk of genetically modified potatoes expressing *EFR* in the Uruguayan regulatory framework. The following are requested: 1) biological data relevant to biosafety aspects of the biological species and genetic transformation and 2) the environmental risk analysis considering any potential benefits.

2.3. BIOSAFETY STUDY

2.3.1. Characteristics of the species

Wild potatoes are mainly located in the Andean region of South America, but they can be found from Southwestern United States to North-central Argentina, Chile and Uruguay. There are 188 species of the genus *Solanum*, which has the ability to produce tubers (Bradshaw et al. 2006). Cultivated potatoes evolved from them through earlier domestication, and are quite different than wild species. Main varieties grown in Uruguay and worldwide, outside the Andean region, belong to the species *Solanum tuberosum* (Spooner and Salas 2006). Potatoes are among the four most important food crops worldwide, along with rice, wheat and maize (FAO 2012). The harvested area annually is close to 20 million hectares, with a production of approximately 300 million tons (International Potato Center, CIP 2011), in 150 countries between latitudes 65 N and 50 S and in altitudes reaching 4000 meters above sea level (Bradshaw et al. 2006). Worldwide produce is growing at higher rates than other major crops (Maldonado et al. 2008).

Uruguay cultivates around 5000 ha of potatoes annually, mainly in three areas of the country: South, East and Northeast. Two crop short cycles (fall and spring) are implemented in the southern region; the summer and longer cycle predominates in the East, while the autumn-winter cycle predominates in the Northeast (MGAP-DIEA 2013).

The crops are installed through vegetative propagation, using tubers as planting material. Uruguay implemented a system ensuring that commercialized tuber-seeds are certified by the National Seeds Institute (INASE 2015a).

The most important biotic constraints in the production of potato worldwide are the late blight caused by *Phytophthora infestans* and bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Fuglie 2007; Bradshaw et al. 2007). The latter is the worst disease faced by farmers in tropical and subtropical climate. Bacterial wilt affects more than 80 countries in a 1.5 million hectare area, the economic damage has been estimated in \$ 950 million annually (Walker and Collion 1998; Champoiseau et al. 2009; Muthoni et al. 2013), and wilt disease incidences up to 100 % in heavily infested soils of African countries have been reported (Bradshaw et al. 2007; Muthoni et al., 2013).

Fuglie (2007) reported that bacterial wilt control in potato, through varietal resistance and crop management, was a top-ranked need primarily in sub-Saharan Africa and East and Southeast Asia. The finding of a single infected tuber can result in enormous economic consequences, not only for an individual grower but for an entire seed potato-producing area (Bradshaw et al. 2007). *R. solanacearum*, once introduced, may persist many years in the soil and spread in agricultural environments. Moreover, their inadvertent and unnoticed spread as contamination or in latent (asymptomatic) infections of seed potatoes is particularly important. Under favorable conditions for disease development, the pathogen can multiply rapidly and cause significant yield loss and economic damage (Bradshaw et al. 2007).

The development of commercial genetically modified potatoes worldwide has been slower than the progress made by other species. As with other crops (corn and cotton), several attempts were made in the past to commercially develop potatoes expressing the Bt toxin (from *Bacillus thuringiensis*), which confers insect resistance. Trials have been conducted in experimental fields in Egypt, South Africa and USA to confirm the efficacy of such feature (Douches et al. 2011). In other regions, the transgenic event was authorized in potatoes exclusively for the production of amylopectin, albeit with contradictory results (Schmidt 2009).

The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) in the United States has received a petition from the J.R. Simplot Company seeking a determination of nonregulated status for Innate™ Potato designated as Russet Burbank event W8. This genotype has been genetically engineered for late blight resistance (for more detail about strategy see Jones et al. 2014), low acrylamide potential, reduced black spot bruising, and lowered reducing sugars. APHIS has recently determined that Simplot's Innate™ potatoes are unlikely to pose a plant pest risk and therefore are no longer subject of regulations in USA (USDA 2014).

In Argentina, a national breeding program developed a genetically modified potato resistant to potato virus Y (MAGP 2015).

2.3.2. Features of the genetically modified organisms

The search for bacterial wilt resistance began in the 1960s in the USA (Schmiediche 1988). Resistance research in Uruguay began with the incorporation of germplasm of the native species *S. commersonii* Dun. and *S. chacoense* Bitter. in early 2000s, with resistance sources reported by Laferriere et al. (1999) and Galván et al. (2006).

Wild species with various degrees of difficulty for introgression through crossbreeding have historically been used to incorporate genes for disease resistance in the genetic basis of cultivated potato. Crossing ability depends on the level of ploidy and the endosperm balance number in the germplasm (Johnston et al. 1980), giving rise to primary, secondary and tertiary gene pools according to Harlan and de Wet classification (1971) (Figure 2). The transference of genes into the potato from *Arabidopsis thaliana* is only possible through genetic engineering, and it would correspond to the quaternary genepool (adapted from Harlan and de Wet 1971).

INIA's potato breeding program introgressed genes of *S. commersonii* (tertiary gene pool) into cultivated potatoes using the diploid species *S. phureja* as a bridge and the natural occurrence of unreduced gametes (sexual polyploidisation) to obtain interspecific clones with diverse degrees of resistance to bacterial wilt (González et al. 2013). These interspecific resistant clones were then backcrossed to cultivated potatoes for improving their agronomic performance.

The first layer of plant innate immunity is the PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-triggered immunity, or PTI. This early defense system recognizes and responds to molecules common to many kinds of microbes, mostly non-pathogens recognized by pattern recognition receptors (PRR).

Among plant PRR, the EF-Tu receptor (EFR) recognizes the Elongation Factor Tu (EF-Tu) a highly conserved PAMP in most bacteria, including plant pathogens (Kunze et al. 2004; Zipfel et al. 2006; Lacombe et al. 2010). Immune response is triggered when EFR recognizes elf18 peptide a conserved epitope from EF-Tu (Zipfel et al. 2006).

From an evolutionary point of view, the *EFR* gene derives from *Arabidopsis thaliana*, and this species is distanced approximately 120 to 150 million years from the cultivated species of potato. However, it has retained some regulatory genes as transcription factors and proteins whose functions are not known (Carvallo et al. 2011).

Bushey et al. (2014) reported that genetically modified crops may contain newly expressed proteins described as 'intractable'. According to these authors, safety assessment of these proteins may require some adaptations to the current assessment procedures. Intractable proteins were defined as those proteins with properties that make them extremely difficult to express in heterologous systems; isolate, purify, or concentrate; quantify (due to low concentration levels); demonstrate biological activity; or prove equivalency with plant proteins. Membrane proteins and resistance proteins (intended as R-proteins, plant pathogen recognition proteins that activate innate immune responses) belongs to the five classes of intractable proteins reported by these authors. The EFR protein is a cell surface receptor that might be considered as an intractable protein as well.

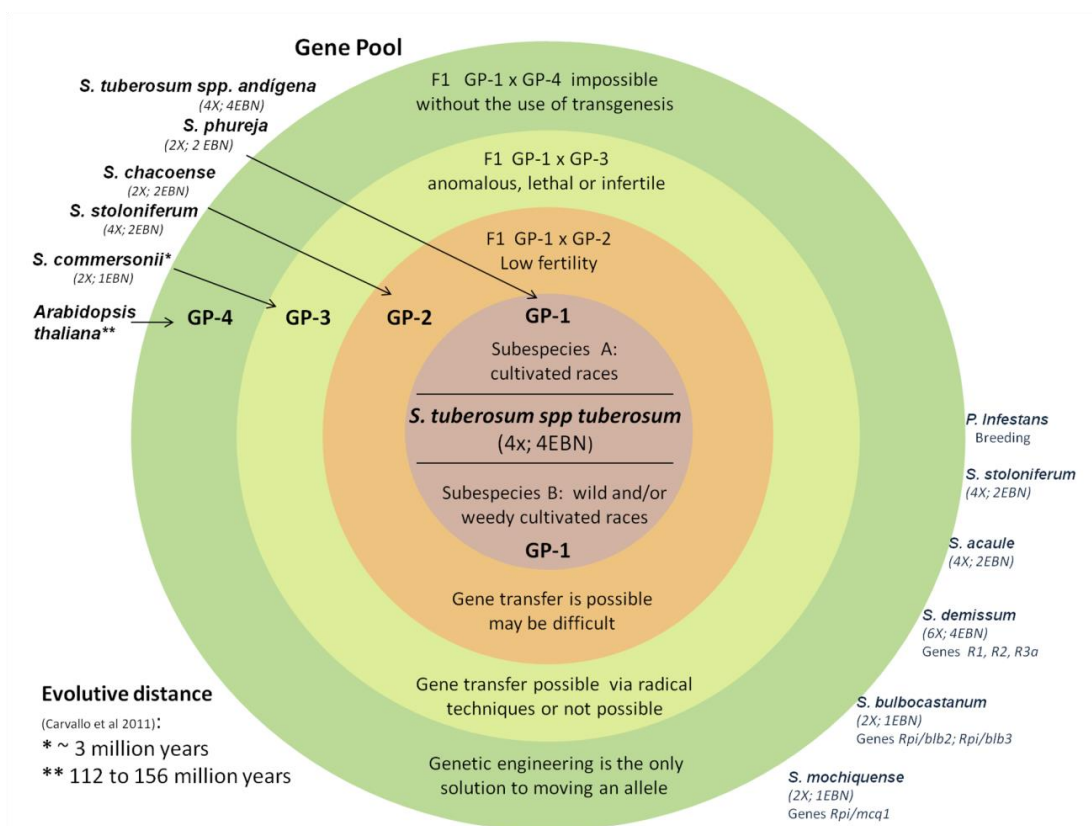


Figure 2. Breeding for resistance in potato. Gene transfer between different Gene Pools (GP) for resistance breeding is shown. INIA's potato breeding program introgressed genes that provide resistance against PVY, late blight and bacterial wilt from different GPs (arrows upper-left). Genetic engineering allows gene transfer in cases where breeding is not possible with classic techniques, e.g. EF-Tu receptor (EFR) used to breed resistance to BW belongs to the quaternary genepool. (Dalla Rizza et al. 2015; adapted from: Harlan and de Wet 1971; Bradeen and Haynes 2011). EBN: Endosperm Balance Number.

Lacombe et al. (2010) reported that the *EFR* gene conferred resistance against a wide range of bacterial pathogens that attacks tomato, tobacco and potato. The *EFR* gene was used to transform a representative cultivar (INIA Iporá) and clone 09509.6, which has quantitative resistance against bacterial wilt introgressed from the wild species *S. commersonii*. As showed in Figure 2 the only way to transfer genes from *A. thaliana* to *S. tuberosum* is through genetic engineering corresponding to the quaternary gene pool of potato (Dalla Rizza et al. 2015; adapted from: Harlan and de Wet 1971).

Preliminary results obtained at INIA with EFR-potato proved that GMO plants of the genotypes INIA Iporá and Clone 09509.6 bear a certain degree of resistance against infection by *R. solanacearum* versus wild type control. The resistance level was expressed by the area under the curve of the disease (AUDPC); lines with lower AUDPC show the highest resistance (Figure 3). Some favorable interaction between the EFR and polygenic resistance contributed from clone 09509,6 genetic background was observed (Boschi et al. 2015).

Line	AUDPC	Line	AUDPC
INIA Iporá efr 3	9,41 A	Clone 09509,6efr 38	0,22 A
INIA Iporá efr 4	12,14 A	Clone 09509,6efr 37	1,70 A
INIA Iporá efr 27	12,47 A	Clone 09509,6efr 41	5,14 A
INIA Iporá efr 12	12,69 A	Clone 09509,6efr 39	8,42 A
INIA Iporá efr 2	13,78 A	Clone 09509,6efr 34	9,13 A
INIA Iporá S/T	40,20 B	Clone 09509,6 S/T	20,29 B

Figure 3. Potato EFR response to *R. solanacearum* inoculation. Area under the disease progress curve (AUDPC) for the five most resistant lines of clone 09509.6-EFR, cultivar INIA Iporá-EFR, and the non-transformed controls (S/T). Means followed by the same letter do not differ, Tukey Statistical Test, $P < 0.05$ (Boschi et al. 2015).

The promoter employed to generate the EFR potato lines comes from the cauliflower mosaic virus CaMV35S and has been widely used in most commercially approved genetically modified events in the soybean and corn crops (INASE 2015b). It is a constitutive promoter expressed in all the organs of the plant (Odell et al. 1985), but in the case of EFR potato, the protein is activated only in presence of bacterial pathogens expressing EF-Tu, therefore, it is not constitutively active (Lacombe et al. 2010).

The *nos* terminator in the non translated 3' region of the nopaline synthase gene of T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* has been used in commercially approved genetically modified events of soybean, corn and cotton (INASE 2015b).

2.4. RISK ASSESSMENT

As mentioned above, risk analysis requires definition of what needs to be protected. It would be reasonable to steer demand to providing arguments to ensure the safety of the element of transformation in human health and to protect the biodiversity of the ecosystem (related species, cultivated species, non-target organisms, potential to become weeds) where it may be released.

2.4.1. Safety of products for human consumption

The asset to be protected in this regard is food safety, i.e., that the gene product causes no harm or adverse effects on consumers, and that the value of food and its nutritional quality are not impaired.

The *EFR* gene from *A. thaliana*, which encode the protein EFR, is found in the *Brassicaceae* family or crucifers (Zipfel et al. 2006; Lacombe et al. 2010), which includes crops significant to production intended for human and animal consumption. The species in that family include, cauliflower, cabbage, broccoli, turnip, mustard and rapeseed. In addition, there are brassicaceae or crucifers used for animal feed production such as forage turnip. The *EFR* gene is reported among other species in *Brassica napus* (NCBI 2016) and *Brassica campestris* (UNIPROT 2016).

There are different concepts to determine whether a protein has allergenic characteristics: Aalberse (2000) (cited by the University of Nebraska 2016) indicated that in order to have allergenicity, the total protein sequence should share 50 % or more of its identity with the allergenic protein. The food code CODEX reports that there must be ≥ 35 % of the identity of an allergenic protein in an 80 amino acid segment (CODEX Alimentarius guidelines 2003). Other regulatory agencies also require that the protein does not present eight amino acids exactly matching the allergenic protein (University of Nebraska 2016).

When comparing the total amino acid sequence of the protein in the EFR database of the University of Nebraska, no allergenic proteins are found with an identity > 35 %. Therefore, the EFR protein would not be reported as allergenic and neither would it have homology with

allergenic proteins, in accordance with the provisions of the Food Code and other regulations or food references (University of Nebraska 2016).

The transgenic proteins resulting from genes from a crop with a safe record, or with very low levels of expression would not need any testing or studies to check they are safe for human consumption (Bushey et al. 2014). Studies are generally conducted to assess the safety issues and the risk of GM crops and their homologous non-GM crops. This process of evaluating the comparative safety is known as substantial equivalence, and it has become the standard approach for safety assessment of GM crops (Bushey et al. 2014; Delaney et al. 2008; Hammond 2008).

2.4.2. Safety of the regulatory elements in the construction and transformation method

The promoter used in the EFR potato transformation events was CaMV35S of the cauliflower mosaic virus. It is a constitutive promoter expressed in most stages of the plant's development and in most organs. The genes of this virus have been reported in plant tissues of bananas, plantains, tomatoes, potatoes, rice, grapes and tobacco. As the virus is reported in these plant species, the CaMV35S promoter is also present in these species (Bejarano et al. 1996; Harper et al. 2002). Therefore, GM foods are not the unique source for the CaMV35S promoter, as it is common for the virus to infect plants of the cruciferous family (Hull et al. 2000). The same authors conducted a detailed analysis of possible unexpected effects on this promoter and concluded that the risk is not greater than would be expected in conventional breeding.

Some reports suggested that the CaMV35S promoter could cause the accidental activation of endogenous viruses or genes, promote horizontal gene transfer or recombine with mammalian viruses. The virus infects the cells of the plant, reproduces and generates about 10^5 particles (viruses) per cell. Thus, each cell of a plant naturally infected with this virus may present 10^5 copies of the CaMV35S. This is in contrast with the few copies of the promoter that are present in every cell of the GMO. Therefore, the number of copies of the CaMV35S promoter ingested when infected plants are consumed is much higher than when a GMO is ingested with this promoter (Hull et al. 2000).

For gene recombination or gene transfer to occur, the CaMV35S promoter insert needs to be located correctly. Therefore, if the genetically modified transgenic food is prepared, the DNA is denatured, and its proper re-naturalization is very unlikely. Another important aspect is that the promoter-containing DNA would be exposed to nucleases, both nucleases of the plant cells, when they break, as nucleases in the animal's gut (Hull et al. 2000).

The other important factor when studying the potential impact on food for human consumption is the method of transformation applied; in the case of EFR potato, it is done by bacterium *A. tumefaciens*. This methodology has already been done in other species marketed for human consumption (Gelvin 2003).

The *nptII* marker gene was the selection marker used for the potato-EFR transformed plants and imparts resistance to kanamycin. According to the opinion of the expert committee under the European Food Safety Authority (EFSA), the *nptII* marker gene may continue being used without restriction. This antibiotic resistance gene is widespread in nature and its corresponding antibiotic is seldom or never used in medicine (EFSA 2006).

Kyndt et al. (2015) reported that the cultivation of yams or sweet potato (*Ipomoea batata*) today is the result of a natural transgenesis, since the ancestral sweet potato does not produce thickened roots and its DNA fragments do not present T-DNA (DNA transfer) from bacteria of the genus *Agrobacterium*. The sweet potatoes that human domesticated and consumed for thousands of years have the ability to thicken their roots and they have T-DNA fragments in their DNA. The authors noted that the trait that enables the plant to store reserves in its roots is one of the major changes between the ancestors and cultivated plants. This would result from the interaction of the plant with the bacteria, and this aspect was relevant for the domestication and consumption of the plant (Kyndt et al. 2015).

No negative effects have been demonstrated with the consumption of *Brassicaceae* species containing the EFR protein, which has been eaten by humans and animals throughout history and lacked the nature of a toxin. Its main importance is that it could increase the production of potato cultivation in areas where the pathogen is the key constraint.

2.4.3. Studying the gene flow

According to Burke and Rieseberg (2003) the concern about the escape of transgenes has focused attention on the potential hybridization between crops and their wild relatives. Transgenes often escape the crops due to: (1) their propagation speed is governed mainly by the effects of their reproductive capacity (adaptation or fitness) measured as the number of offspring that each plant gives to the next generation, and not by the migration rate, and (2) therefore, only the transgenes that are highly advantageous in fitness will have a significant ecological impact.

According to these authors and based on the analysis of the behavior of a transgene for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower, the research on the risks associated with the escape of transgenes should focus on the effects of fitness of the gene(s) in question.

The cultivated potato *S. tuberosum* L. belongs to the Petota section, series Tuberous potato. It was domesticated when agriculture began sometime between 6,000 (oldest fossils) and 10,000 years ago, somewhere in South America. Ancient growers have been the main factor in this process of domestication and enrichment of cultivated potatoes with wild species germplasm (Spooner et al. 2005). Only the species belonging to the Petota section would have the potential of breeding with the cultivated potato.

Domestication and diversification of crops from diploids to pentaploids result from the introgression of genes, auto/allopolyploid, interspecific hybridization, and sexual compatibility with many wild species. However, how and when this happened in the potato crop is still unknown (Rabinowitz et al. 1990).

In the center of origin of the species, the main concern is the unintentional introgression of genes in the original and native gene pool. However, the introduction of commercial varieties in the Andean agro-ecosystem has already changed the original or native genetic reserve of the local varieties cultivated, in farmers fields and in their areas (Ghislain et al. 2015).

In the center of origin there are wild species and local varieties that are sexually compatible, and given the introduction of commercial varieties developed elsewhere in the world, the unintentional introgression of exotic genes could have taken place already. Concern for the cultivation of GM potatoes in the center of origin is based on cultural values, as well as the scientific claims that the flow of genes in some species may probably occur under certain

biological and physical conditions, hence altering the natural genetic heritage. However, research has only focused on the flow of genes and not on the destination of foreign genes and their impact on biodiversity (Ghislain et al. 2015).

In Uruguay there are two wild species (*S. chacoense* and *S. commersonii*) of the Solanaceae family, related to *S. tuberosum*. These species are distributed in southern Brazil, the west of Argentina, Paraguay and Uruguay (Hawkes and Hjerting 1969).

The existing mechanisms of hybridization between the various species of the genus *Solanum* result from certain balances of the endosperm, levels of ploidy and inter-species compatibility. The concept of the endosperm balance number (EBN) emerged as an explanation of this phenomenon. The genetic and physiological reasons of EBN are not reported, but the concept is the one used and validated. EBN identical species can be crossed, but those species with different EBN fail to cross naturally (Johnston et al. 1980).

The EBN is 1 for *S. commersonii* and 2 for *S. chacoense*, while that of *S. tuberosum* is 4. Therefore, this fact by itself can greatly reduce the odds of natural hybridization between *S. tuberosum* and native species. Bravo-Almonacid et al. (2012) performed an interspecific out-crossing trial to determine the magnitude of possible natural gene flow between a transgenic line SY233 selected for PVY resistance in Argentina and its wild relative *S. chacoense*. The result of this study, which included the analysis of 1,700 fruits and 41,200 seeds from *S. chacoense*, indicated that the probability for such a crossing—should it occur in nature—is extremely low.

In addition, the possible hybridizations that can occur with different levels of EBN in the vast majority of cases give rise to sterile plants or to plants with an impaired fertility. This again reduces the likelihood of meeting the conditions set by Evenhuis and Zadoks (1991) for the introgression and stabilization of a transgene in wild species of interest, since there are a number of barriers to prevent hybridization and natural introgression, including geographical isolation, imbalances of the endosperm and multiple ploidy levels (Love 1994).

To study the flow of genes from a crop of genetically modified potato and the possibility of hybridizing with wild species or landraces, other factors need to be considered, including the biology of the species, time of flowering, sexual compatibility, the population of pollinating insects, seed viability in berries and the adoption of the varieties by farmers. This last aspect is

of utmost importance to keep varieties or genes of genetically modified varieties in production (Andersson and de Vicente 2009).

Another consideration is that the bacterium *R. solanacearum* is carried on latently in the rhizosphere of wild species and weeds asymptotically. In the specific case of *S. commersonii*, the bacteria would also be present asymptotically, and the possible presence of the transgene would not contribute with an additional competitive edge (it would not enhance its fitness). Besides, the introgression of the *EFR* gene into *S. commersonii* would be beneficial in order to avoid latent presence of the bacterial (asymptomatic presence).

In the study by Ghislain et al. (2015), the authors proved that following the introduction of varieties of commercial potato there was an unintentional flow of genes to potato landraces under favorable conditions of fertility, flowering, pollination and sympatry. They noted that none of these local varieties produced hybrids derived from a successful gene flow event between 'Yungay' and landraces potato. Therefore, these authors concluded that even under favorable gene flow conditions, farmers have not inadvertently incorporated genes of the 'Yungay' commercial variety in the germplasm of their native potato.

Cultivated potato plants do not hybridize with other weed species that do not belong to the Petota section. In Uruguay for example *S. sisymbriifolium* is endemic but belong to the Crinitum section and therefore it does not affect the possibility of transgenic transferring. Transgenic escapes to other cultivated varieties of potatoes is not a matter of concern, nor is it important to seek their protection (Ghislain et al. 2015), because the propagation pattern in production systems is through tubers, and they are not competitive outside the production area (Love 1994). In addition, in Uruguay, approximately 5000 ha per year of potato are planted in two seasons (autumn and spring) and mainly distributed in the department of San José. The potato is cultivated using vegetative propagation with certified seeds (INASE 2015a); therefore, the risk of pollen transfer affecting farmers that grow non-GM potatoes is null or minimum.

2.4.4. Impact on non-target organisms

The genetically modified potato plants with the *EFR* gene express a protein that is a cell surface receptor that already exists in plants, which allows the plant to activate its defense mechanism against pathogenic bacteria (Lacombe et al. 2010). The mechanism is generated

when the pathogen comes in contact with the plant and detects the presence of the bacteria's PAMP and triggers all the plant's defense mechanisms at the cellular level (Boller and Felix 2009).

Changes in soil microflora with respect to the inserted gene should not be different from the introduction of a culture of cruciferous or the planting of a new commercial variety of potatoes in the farmer's production system.

In the genetically modified potato with the *EFR* gene, there is no information suggesting it could release substances toxic to other organisms; therefore, there is no reason to consider that such a GM may have adverse effects on other living beings.

2.4.5. Study on the possibility of developing weed species

The possibility that GM potatoes may become weeds or invasive plants is a major concern in biosafety studies. Voluntary potato plants in vegetative stages have failed to survive outside the cultivated areas; consequently, their potential impact on populations of native vegetation is minimal (Love 1994).

Potatoes do not hybridize with species that are non-tuberous weeds of the *Solanum* species. With that in mind, cross-pollination was studied between *S. tuberosum* and two non-tuber nightshade species considered weeds (*S. nigrum* and *S. dulcamara*). The genetically modified potatoes were planted 20 m away from these two species, and all the aspects related to the transfer of pollen were considered. More than 9,000 seedlings of the two weed species were obtained and none of them showed the presence of the transgene (McPartlan and Dale 1994).

The number and extent of the barriers to hybridization make it very unlikely or impossible for the genes from GM to naturally introgress into other species. There are no reports of spontaneous potato plants surviving, proliferating and establishing as weeds, because they do not have good competitive capacity versus similar plants in the same environment (Evenhuis and Zadoks 1991).

After a commercial crop of potatoes, new plants may be found in the subsequent seasons, either in the area or near the site, and this is mainly due to the unharvested tubers

that may remain with enough viability to germinate for seven years (Conner 2006) but in any case they do not could survive more than a short period.

In Uruguay potato cultivation is carried out continuously rotating with other crops of agricultural importance in which the use of herbicides is accepted to curb weeds. Therefore, the spontaneous occurrence of potato plants in other crops is generally controlled by means of herbicides (Aldabe 2000).

In the biosafety study, the concern in this regard is when plants are designed to produce substances with pesticide properties, an issue that does not apply to the EFR potato. Then, the possibility for this genetically modified potato becoming a weed or an invasive species is mostly immaterial, and the odds, if any, are remote.

2.4.6. Potential benefits of the potato-EFR crop

Before authorizing a new GMO, the country's regulatory systems generally study the associated risk and the potential negative consequences on the environment and food safety. Addressing the topic under this perspective is very important, but sometimes these studies ignore the potential benefits for farmers, industry and the population as a whole entailed by the implementation of a new technology in production. In addition to this, in some cases people never become aware of the consequences of what they lose by not applying the new technology in food production.

Despite the heterogeneity of the impact analyses on GM crops, the mean agronomic and economic advantages have been significant in key aspects such as the increase of performance and a reduction in the use of chemicals. Farmer profits are higher in developing countries than in developed countries (Klumper and Qaim 2014).

The main potato producers are China, Russia, India, United States and Ukraine. The regions with the highest yields per acreage are the United States and Europe, while in some regions such as Africa, Latin America and Asia the production potential is limited mainly by biotic problems in production (FAO 2008).

Potatoes are an important crop in food sovereignty, as recognized during the famine suffered by continental Europe in the late eighteenth century when grain crops were scarce. However, potato growers also experienced the devastating effects of potato diseases also

known worldwide, as the potato famine that struck northern Europe because of the late blight, a disease caused by *P. infestans* (FAO 2008).

All these experiences have led to educating people about the management of crops and disease worldwide. Currently, late blight is the most important disease affecting potato crops, but it is addressed by farmers through tillage practices, planting dates, harvest timing, and seed quality, among the many tasks considered, but essentially there are fungicidal chemicals that help control the disease (FAO 2008).

Bacterial wilt caused by *R. solanacearum* is the second economically significant biotic problem; it is one of the most destructive diseases worldwide that affects 8 % of the productive area. In addition, to the economic damage, there are other negative damages that are more difficult to quantify, including social and environmental damages and the preclusion of producing other crops in the future (Walker and Collion 1998; Bradshaw et al. 2007).

The Integrated Pest Management (IPM) promoted by CIP and FAO is the tool used to control the main biotic problems that jeopardize potato crops. Training of farmers and the adoption of this IPM technology in the production of potatoes succeeded in reducing the costs of the applications against diseases and pests by 75 %, which has had a positive impact on the environment and significantly reduced the exposure of farmers to chemicals (FAO 2008).

Added to the IMP, getting *R. solanacearum*-resistant cultivars would be a very important tool that would allow potato cultivation to be undertaken in areas and regions of the world that currently have a very limited production. Unlike the case of late blight, there are no chemicals to assist farmers in the control of this disease (FAO 2008).

With regard to biosafety levels for handling EFR potato, in accordance with the current provisions, the work would be done under Biosafety Level 1 (BS1-P) because of several reasons: it is not a human or animal pathogen. GMO potato plants have very low competitive ability outside the culture, and their ability to spread to related species is nil or very low. Therefore, it would not be an environmental hazard in case of accidental release.

To answer the first question of the FP by the evaluator - What is it that we do not want to see harmed? This question addressing the preservation of biodiversity and the inconveniences that could stem from the adoption of the EFR potato is related to the possibility of hybridization with related species (gene flow), leading the plant to become an invasive weed. Therefore, this possibility is from very low to zero.

Potential impacts on non-target organisms would not be too relevant since this gene is already present in the wild, it triggers a response in the potato plant and does not release any toxic substances into the environment. The other aim is to protect the production of potato worldwide; the adoption of this technology could lead to an increased cultivation, mainly in regions of low production potential due to limitations caused by biotic issues.

When analyzing the question 'Can you imagine a harmless form of action?' one should analyze all the aspects that might be affected by the adoption of this technology, while considering all the possible actions that could reduce the potential damage. So the question arises 'What possible harms could result?' The damages that may result are not closely related to the implementation of this new technology in transgenic potato. The EFR-potato crops may reduce the application of chemicals and contribute with IPM in the control of pests and diseases. Our approach agree with the Jones et al., (2014) argue that state for sustainable intensification of crop production, the disease control should as far as possible be achieved using genetics rather than using costly recurrent chemical sprays.

When you do not know what you want to incorporate, the current regulatory framework applies a precautionary principle. After studying the GMO and its possible negative and positive impacts in the country's context, the conclusion is that the risks that the negative aspects may happen because of the implementation of this technology in domestic production are from very low to zero. The benefits for the farmer, the consumer and the population as a whole can be very relevant. As in all the risk assessment there is a possibility for mishaps, so if anything goes wrong, contingency measures should be taken immediately.

2.5. CONCLUSIONS

Without having conducted a food safety analysis, *a priori*, the adoption of GM technology with the EFR gene shows no evidence of any reasonable Biosafety risks. Biodiversity and germplasm conservation would not be exponentially harmed by the adoption of this technology. Any evidence arise that human health could be in jeopardy.

The benefits could be significant for the farmer, because of the possibility of engaging in crops in previously limited areas, and the opportunity to work with other Solanaceous crops in those production systems.

The global benefits would be very promising, since there would be a reduction of the incidence of a disease that affects 8 % of the area devoted to potatoes, with the ensuing productive, social and environmental consequences.

As in any risk analysis, there is always a chance for a negative phenomenon to occur; therefore, contingency measures to minimize damage should be a priority during implementation. Finally, we consider that the recently USDA/EPA consideration that the Simplot's Innate™ potatoes do not pose a plant pest risk and therefore are no longer subject of regulations in USA is a good precedent to take into account for this trait.

2.6. REFERENCES

Aldabe L (2000) Producción de hortalizas en Uruguay. Montevideo: Épsilon. 269p.

Andersson MS, de Vicente MC (2009) Potato (*Solanum tuberosum* L) in gene flow between crops and their wild relatives. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 367–402

Bejarano ER, Khashoggi A, Witty M, Lichtenstein C (1996) Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:759–

Boller T, Felix GA (2009) Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 379–406.

Boschi F, Vilaró F, Galván G, Siri M, Menoni M, Murchio S, Ferenczi A, Dalla Rizza M (2015) Evaluación de la respuesta de genotipos transgénicos de papa *Solanum tuberosum* L. con el receptor EFR inoculados con *Ralstonia solanacearum*. Jornada Técnica. Unidad de Biotecnología Serie Actividades de Difusión N° 755. IX Jornada de Agrobiotecnología. Las Brujas. Uruguay. Pp. 9-13. Publishing PhysicsWeb. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/ad-755.aspx> Accessed 26 June 2016.

Bradeen JM, Haynes KG (2011) Introduction to potato. In: Genetics, genomics and breeding of potato. Ed. Brandeen JM and Kole C. Science publishers, p 296.

Bradshaw JE, Bryan GJ, Ramsay G (2006) Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. Potato Research, 49: 49–65.

Bradshaw JE, Gebhardt C, Govers F, Mackerron DKL, Taylor MA, Ross HA (2007) Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Edited by Vreugdenhil D. Elsevier, 857 p.

Bravo-Almonacid F, Rudoy V, Welin B, Segretin ME, Bedogni MC, Stolowicz F, Criscuolo M, Foti M, Gomez M, López M, Serino G, Cabral S, Dos Santos C, Huarte M, Mentaberry A (2012) Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. *Transgenic Res.* 21:967-982.

Burke JM, Rieseberg LH (2003) Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science, Brevia* 300:1250.

Bury J, Dekeyser R (2004) Biosafety in the Laboratory. Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology. 3rd, revised edition. Bélgica. Pp. 72.

Bushey DF, Bannon GA, Delaney BF, Graser G, Hefford M, Jiang X, Lee TC, Madduri KM, Pariza M, Privalle LS, Ranjan R, Saab-Rincon G, Schafer BW, Thelen JJ, Zhang JX, Harper MS (2014) Characteristics and safety assessment of intractable proteins in genetically modified crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* ;69 (2): Pp. 154-70.

Cartagena Protocol (2000) Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 30p. On line: <https://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-es.pdf>. Accessed 10 March 2016.

Carvalho MA, Pino MT, Jeknic´ Z, Zou C, Doherty CJ, Shiu SH, Chen THH, Thomashow MF (2011) A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/err066.

Champoiseau, PG, Jones JB, Allen C (2009) *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties [Online]. Madison: American Phytopathological Society. Available at <http://www.apsnet.org/online/feature/ralstonia/> Accessed 10 July 2016.

Codex Alimentarius (2003) Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO

Food Standards Programme, Rome. CAC/GL 45.
<http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm> Accessed 20 April 2016

CONABIA (2016) Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Buenos Aires. Argentina. Consultado el 15 de marzo de 2016. On-line: http://www.minagri.gob.ar/site/agregado_de_valor/biotecnologia/25_Convocatoria%20CONABIA/index.php Accessed 18 April 2016

Conner AJ (2006) Biosafety Evaluation of Transgenic Potatoes: Gene Flow from Transgenic Potatoes. International Symposium. Ecological and Environmental Biosafety of Transgenic Plants. Pp. 127-140.

Dalla Rizza, M, Vilaró, FL, Torres, DG, and D Maeso (2006) Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the uruguayan breeding program. *Am. J. Pot Res* 83: 297. doi:10.1007/BF02871590.

Dalla Rizza M (2015) Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas. III Jornada Nacional de Fitopatología. I Jornada Nacional de Protección Vegetal. Sociedad Uruguaya de Fitopatología. Montevideo. Uruguay. <http://www.sufit.org.uy/iii-jornada-nacional-de-fitopatologia-y-i-jornada-nacional-de-proteccion-vegetal/> Accessed 19 August 2016

Delaney B, Astwood JD, Cunny H, Eichen Conn R, Herouet-Guicheney C, MacIntosh S, Meyer LS, Privalle L, Gao Y, Mattsson J, Levine M, The ILSI International Food Biotechnology Committee Task Force on Protein Safety (2008) Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food Chem. Toxicol.* 46 Suppl 2, S71–S97.

Douches DS, Coombs JJ, Lacey LA, Felcher KJ, Pett WL (2011) Evaluations of Transgenic Potatoes for Resistance to Potato Tuberworm in the Laboratory and Field. *Potato Association of America Am. J. Pot Res* 88: Pp. 91–95.

Drezner DW (2007) All politics is global: explaining international regulatory regimes. Princeton: Princeton University Press; Chapter One. Pp. 30.

EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. ISBN: 92-9199-029-9. Pp. 121. <http://www.gmo->

compass.org/eng/safety/human_health/126.position_efs_a_antibiotic_resistance_markers.html

Accessed 19 August 2016.

Evenhuis A, Zadoks JC (1991) Possible hazards to wild plants of growing transgenic plants. A contribution to risk analysis. *Euphytica*. 55: 81-84.

FAO (2012) Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma. Italia. Pp. 42.

FAO (2008) La Papa. Presentación de nuestro invitado especial: *Solanum tuberosum*, el «tubérculo humilde» que se propagó desde su cuna andina a través de seis continentes, y conjuró el hambre, alimentó el desarrollo económico y modificó el curso de la historia mundial. On-line: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0500s/i0500s02a.pdf>. Accessed 10 March 2016.

FAO (2007) Instrumentos de la FAO sobre la Bioseguridad. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. ISBN 978-92-5-305729-0. Roma. Italia. Pp. 166.

Ferenczi MA (2013) Establishment of the Uruguayan biosafety framework and a regulatory perspective of environmental risk assessment for transgenic crops engineered with complex traits. *Plant Breeding, Genetics and Biotechnology - Horticulture – Doctor of Philosophy*. Thesis. Michigan State University. USA. Pp. 317

Ferreira JL, de Almeida Cançado GM, Borém A, Silva Gomes W, Alemu Setotaw T (2012) Biosafety and Detection of Genetically Modified Organisms, Transgenic Plants - Advances and Limitations, PhD. Yelda Ozden Çiftçi (Ed.), ISBN: 978-953-51-0181-9, InTech, On line: <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-and-limitations/biosafety-and-detectionof-genetically-modified-organisms> Accessed 25 March 2016

Fuglie KO (2007) Priorities for potato research in developing countries: Results of a survey. *American Journal of Potato Research*, 84:353-365.

Galván G, Franco Fraguas L, Quirici L, Santos C, Silvera E, Siri MI, Villanueva P, Raudiviniche L, González M, Torres D, Castillo A, Dalla Rizza M, Vilaró F, Gepp V, Ferreira F, Pianzola MJ (2006) *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II IICA. Uruguay. p. 87-102.

Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, p. 16–37.

Ghislain M, Montenegro JD, Juarez H, Del Rosario Herrera M (2015) Ex-post analysis of landraces sympatric to a commercial variety in the center of origin of the potato failed to detect gene flow. *Transgenic Res.* 24:519–528.

González M, Galván G, Siri MI, Borges A, Vilaró F (2013) Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. *Agrociencia*. Uruguay. v.: 17 1, p.: 45 – 54.

Gray A (2012) Problem Formulation in Environmental Risk Assessment for Genetically Modified Crops: A Practitioner’s Approach. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). Collection of Biosafety Reviews Vol. 6. Italia: 10-65

Hammond BG (2008) *Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Harlan JR, de Wet JMJ (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 20: 509-517.

Harper G, Hull H, Lockhart B, Olszewski N (2002) Review. Viral sequences integrated into plant genomes. *Annual Review of Phytopathology* 40:119–36.

Hartung F, Schiemann J (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal*. 78 742–752.

Hawkes JG, Hjerting JP (1969) The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study. pp. xxiii + 525 pp.

Hull R, Covey SN, Dale P (2000) Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecology in Health and Disease*. ISSN 0891-060X. 12: 1-5

INASE (2015a) Estándar de Producción y Comercialización de Semilla de Papa. Instituto Nacional de Semillas. On-line: www.inase.org.uy Accessed 25 April 2016

INASE (2015b) Registro Nacional de Cultivares. Cultivos de Verano. Instituto Nacional de Semillas. On-line: www.inase.org.uy Accessed 25 April 2016

Johnson KL, Raybould AF, Hudson MD, Poppy GM (2007) How does scientific risk assessment fit within the wider risk analysis? *Trends in Plant Science* 12: 1-5.

Johnston SA, den Nijs TPN, Peloquin SJ, Hanneman RE (1980) The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 57: 5–9.

Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, Pp. 323-329.

Jones JD, Witek K, Verweij W, Jupe F, Cooke D, Dorling S, Tomlinson L, Smoker M, Perkins S, Foster S (2014) Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 20130087. On-line: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0087> Accessed 15 March 2016

Klumper W, Qaim M (2014) A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS ONE* 9 (11): e111629. doi:10.1371/journal.pone.0111629

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.

Kyndt T, Quispea D, Zhaic H, Jarred R, Ghislain M, Liuc Q, Gheysen G, Kreuze JF (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Plant Biology*. *PNAS*. vol. 112 no. 18: 1-6

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse P, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz BJ, Jones JD, Zipfel C (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology*. doi:10.1038/nbt.1613

Laferriere LT, Helgeson JP, Allen C (1999) Fertile *S. tuberosum* and *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 98:1272-1278.

Love SL (1994) Ecological risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada. *News and Reviews*. Vol. 71: Pp. 647-658

MAGP (2015) Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Argentina Líder Mundial en Biotecnología. On-line: http://www.casarosada.gob.ar/pdf/PPT_-_DOS_EVENTOS.pdf Accessed 10 April 2016

Maldonado L, Suárez V, Thiele G (2008) Estudio de la adopción de variedades de papa en zonas pobres del Perú Centro Internacional de la Papa. ISSN 0256-8756 Ciencias Sociales. Perú. Pp. 46.

McPartlan HC, Dale PJ (1994) An assessment of gene transfer by pollen from field grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. *Transgenic Research* 3: 216–225.

MGAP-DIEA (2013) (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca – Dirección de Estadísticas Agropecuarias). Anuario Estadístico Agropecuario 2013. On-line: www.mgap.gub.uy Accessed 20 March 2016

MGAP-GNBIO (2015) Gabinete Nacional de Bioseguridad. OGM autorizados en Uruguay. On-line: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,gnbio,gnbio-ogms-autorizados-en-uruguay,O,es,0>, Accessed 10 January 2016

Muthoni J, Shimelis H, Melis R, Kinyua ZM (2013) Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al.) in the Tropical Highlands. *American Journal of Potato Research* 90: 301–402.

NCBI (2016) The National Center for Biotechnology Information. LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR. On-line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/106371753> Accessed 12 April 2016

Nickson TE (2008) Planning Environmental Risk Assessment for Genetically Modified Crops: Problem Formulation for Stress-Tolerant Crops. *Plant Physiology*. Vol. 147, pp. 494–502.

Odell J, Nagy F, Chua N (1985) Identification of DNA Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter. *Nature*. Vol 313. Pp. 810-812.

Pellegrini PA (2013) What risks and for whom? Argentina's regulatory policies and global commercial interests in GMOs. *Technology in Society*. Elseiver. ISSN 0160-791X 35. Pp. 129–138.

Qayyum Rao A, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Ali Shahid A, Husnain T, Riazuddin S (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* 27. Pp. 753–763

Rabinowitz D, Linder CR, Ortega R, Begazo D, Murguía H, Douches DS, Quiros CF (1990) High levels of interspecific hybridization between *Solanum sparsipilum* and *S. stenotomum* in experimental plots in the Andes. *Am Pot J* 67:73–81

Raybould A (2010) Reducing uncertainty in regulatory decision-making for transgenic crops. More ecological research or clearer environmental risk assessment? *GM Crops* 1(1):1-7.

Schmidt RM (2009) Amflora Facts. BASF. Plant Science Agricultural Center. On-line: [http://fundacion-antama.org/wp-content/uploads/2010/03/2009.10.29.Amflora Starch Facts.pdf](http://fundacion-antama.org/wp-content/uploads/2010/03/2009.10.29.Amflora_Starch_Facts.pdf) Accessed 12 April 2016

Schmiediche P (1988) Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. In: Report of the planning conference on bacterial diseases of the potato in 1987. French, E.R. ed. Lima, Peru. International Potato Center. pp.19–28.

Spooner DM, Salas A (2006) Structure Biosystematics and Genetic Resources. Chapter 1. Pp. 39.

Spooner DM, McLean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ (2005) A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14694–14699.

Suter GW (2000) Generic assessment endpoints are needed for ecological risk assessment. *Risk Anal* 20(2):173–178.

Traynor PL, Adair D, Irwin R (2001) A Practical Guide to Containment. Greenhouse Research with Transgenic Plants and Microbes. ISBN: 0-9703604-0-1. Minnesota. USA. Pp. 74.

UN (1992) Organización de Naciones Unidas. Convenio de la Diversidad Biológica. Rio de Janeiro. Brasil. On-line: <http://www.un.org/es/events/biodiversityday/convention.shtml> Accessed 10 March 2016

UNIPROT (2016) The Universal Protein Resource (UniProt). Names and Taxonomy. On-line: <http://www.uniprot.org/uniprot/F8V1G4> Accessed 12 April 2016

University of Nebraska (2016) Allergen Online. Allergen Protein database On-line: <http://www.allergenonline.com/> Accessed 22 April 2016

Uruguay, MGAP (1996a) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Creación del Comité de Análisis de Riesgo en Plantas Transgénicas. Dirección General de Servicios Agrícolas. Resolución de 01/13/96.

Uruguay, MGAP (1996b) Autorización para ensayos de investigación con *Eucalyptus* tolerante al herbicida glifosato. Dirección General de Servicios Agrícolas. Resolución de 09/27/96.

Uruguay, MGAP-MVOTMA-MSP-MEF (2014) Resolución N° 65. Montevideo. Uruguay.

Uruguay, MGAP-MVOTMA-MSP-MEF (2008) Decreto No. 353/008 del 07/21/08. Sobre la Bioseguridad de las plantas genéticamente modificadas y sus partes.

USDA (2014) Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. [Docket No. APHIS-2014-0076]. Vol. 79, No. 217. Pp. 66689. On-line: https://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS_20141110c.pdf Accessed 18 April 2016

Walker T, Collion MH (1998) Priority setting at CIP for the 1998-2000 Medium Term Plan. International Potato Center. Lima, Perú. 48p.

Wolt JD, Keese P, Raybould A, Fitzpatrick JW, Burachik M, Gray A, Olin SS, Schiemann J, Sears M, Wu F (2010) Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic Res* 19:425–436.

Woodfield DR, White DWR (1996) Breeding strategies for developing transgenic white clover cultivars. Special publication-agronomy society of New Zealand, 125-130.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-60.

3. Análisis molecular y evaluación de la resistencia a *Ralstonia solanacearum* de eventos transgénicos de papa EFR

Boschi Federico¹, Vilaró Francisco², Galván Guillermo³, Murchio Sara², Schwartzman Claudia², Siri María⁴, Ferreira Virginia⁴, Zipfel Cyril⁵, y Dalla Rizza Marco².

¹Instituto Nacional de Semillas. Evaluación y Registro de Cultivares. Barros Blancos. Uruguay.
fboschi@inase.org.uy

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

³Facultad de Agronomía. Universidad de la República

⁴Facultad de Química. Universidad de la República

⁵The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

Título abreviado: **Evaluación de Papa Transgénica**

3.1. RESUMEN¹⁴

La papa es el tercer cultivo alimenticio a nivel mundial y el principal cultivo hortícola en el Uruguay. *Ralstonia solanacearum* causante de la marchitez bacteriana es el segundo problema biótico en la producción de papa a nivel mundial y la principal enfermedad bacteriana. Las plantas pueden reconocer potenciales patógenos a través de dos modos de percepción. Un sistema detecta moléculas microbianas denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que conduce a la inmunidad provocada por PAMP (PTI). El otro sistema evolucionado permite reconocer mediante proteínas R a los efectores secretados por los patógenos y generan la inmunidad activada por efectores (ETI). El receptor EFR es una PRR de *Arabidopsis thaliana* que reconoce el PAMP EF-Tu, que es una de las proteínas más conservadas y abundantes en bacterias fitopatógenas. El objetivo general de este trabajo es contribuir al desarrollo de cultivares de papa con resistencia a *R. solanacearum*, combinando estrategias de mejoramiento genético. Se estudió la respuesta a *R. solanacearum* de 10 eventos transgénicos de INIA-Iporá-EFR

¹⁴ Este capítulo fue elaborado para ser enviado y con las normas para autores de Agrocienca.

(susceptible) y 10 del Clon-09509.6-EFR (parcialmente resistente). Inicialmente se realizó la detección del gen EFR, la determinación del número de copias por Real Time PCR, expresión proteica por Western blot y funcionalidad por ROS. Se evaluó la respuesta a *R. solanacearum* mediante inoculación con la cepa UY031, se midió el avance de la enfermedad con un índice del 0 (sin síntomas) al 4 (plantas muertas) y se realizó el análisis del Área bajo la curva de la Enfermedad (AUDPC). Las líneas 38, 37, 41, 34 y 39 que presentan expresión de la proteína EFR en modo funcional y con AUDPC 1.9, 2.8, 3.9, 7.8 y 8.0 respectivamente se diferenciaron del valor 22.0 del Clon-09509.6 sin transformar. Las líneas más resistentes de INIA-Iporá mostraron valores de AUDPC entre 11 y 14 y presentaron expresión y funcionalidad de la proteína. A partir de estos resultados se puede inferir que se han desarrollado genotipos promisorios con resistencia a *R. solanacearum* en el marco del sistema regulatorio nacional en Bioseguridad. El gen EFR genera respuesta adicional a la resistencia obtenida por mejoramiento genético convencional y permitiría a la planta controlar la presencia bacteriana pasando de una relación hemibiótrofa a biótrofa.

Palabras clave: Mejoramiento genético, OGM, *Solanum tuberosum*, *Ralstonia solanacearum*

Molecular analysis and evaluation of *Ralstonia solanacearum* resistance of transgenic potato events EFR

3.2. SUMMARY

The potato is the third food crop in the world and the main horticultural crop in Uruguay. *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt is the second biotic problem in potato production worldwide and the main bacterial disease. Plants can recognize potential pathogens through two modes of perception. A system detects microbial molecules called pathogen-associated molecular patterns (PAMP), through pattern recognition receptors (PRR), which PAMP triggered immunity (PTI). The other evolved system allows to recognize by R proteins to the effectors secreted by the pathogens and generate the effector triggered immunity (ETI). The EFR receptor is a PRR from *Arabidopsis thaliana* that recognizes PAMP EF-Tu, which is one of the most conserved and abundant proteins in phytopathogenic bacteria. The general objective of

this work is to contribute to the development of potato cultivars with resistance to *R. solanacearum*, combining strategies of genetic improvement. The response to *R. solanacearum* of 10 transgenic events of INIA-Iporá-EFR (susceptible) and 10 of Clon-09509.6-EFR (partially resistant) was studied. Initially the detection of the EFR gene, the determination of the number of copies by Real Time PCR, protein expression by Western blot and functionality by ROS were performed. The response to *R. solanacearum* was evaluated by inoculation with the strain UY031, the disease progression was measured with an index of 0 (non symptoms) to 4 (dead plants) and an analysis of the Area Under the Disease Curve (AUDPC). Lines 38, 37, 41, 34 and 39 which exhibit EFR protein expression in functional mode and with AUDPC 1.9, 2.8, 3.9, 7.8 and 8.0 respectively, differed from the 22.0 value of untransformed Clone-09509.6. The most resistant lines of INIA-Iporá showed values of AUDPC between 11 and 14 and presented expression and functionality of the protein. From these results it can be inferred that promising genotypes with resistance to *R. solanacearum* have been developed within the framework of the national regulatory system in Biosafety. The EFR gene generates additional response to the resistance obtained by conventional genetic improvement and would allow the plant to control the bacterial presence from a hemibiotroph to a biotroph relation.

Key words: Genetic Breeder, GMO, *Solanum tuberosum*, *Ralstonia solanacearum*

3.3. INTRODUCCIÓN

3.3.1. Importancia del cultivo de papa e influencia de *R. solanacearum*

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los cuarto cultivos alimenticios más importante a nivel mundial, junto al arroz, el trigo y el maíz (FAO, 2012). La producción está en el entorno de los 300 millones de toneladas por año (Centro Internacional de la papa, CIP 2011), distribuida en 150 países aproximadamente, situados entre las latitudes 65 N y 50 S y hasta altitudes de 4000 metros sobre el nivel del mar (Bradshaw *et al.*, 2006). En el mundo, la producción de papa crece a mayores tasas que otros cultivos importantes (CIP, 2011).

En el Uruguay es el principal cultivo hortícola, se siembran alrededor de 5000 ha por año en dos ciclos de cultivos (otoño y primavera) y es el principal producto alimenticio fresco que ingresa anualmente al mercado modelo con más 50.000 toneladas (Mercado Modelo, 2016)

Los objetivos de los programas de mejoramiento genético de papa a nivel mundial, han sido desarrollar cultivares mejores en: sus características culinarias y organolépticas, su adaptación a determinados sistemas de producción, con determinados beneficios agronómicos y resistencia a enfermedades y plagas (Vilaró *et al.*, 2000; Dalla Rizza *et al.*, 2006).

En el cultivo de papa el recambio varietal ha sido muy lento comparado con otras especies, debido a factores como la baja tasa de multiplicación, las dificultades en la comercialización y promoción. Se evidencia en el actual uso de Russett Burbank y Bintje, dos de los cultivares más plantados en el mundo y desarrollados hace más de 100 años (Vilaró *et al.*, 2000).

El desarrollo de cultivares con resistencia a enfermedades es uno de los principales cometidos de los centros de investigación, en la actualidad no existe un cultivar comercial de papa caracterizado como resistente a la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum*. Esto se podría explicar por las limitaciones génicas como fuentes de resistencia que tienen los programas de mejoramiento genético, lo variable que son las enfermedades bacterianas y el desarrollo de otras tecnologías que apuntan al control integrados de plagas.

La búsqueda de resistencia a marchitez bacteriana comenzó en la década de 1960 en USA (Schmiediche, 1988). En Uruguay comenzó a fines del siglo XX con la incorporación fuentes de resistencia de la especie *S. commersonii* Dun. (cmm) al germoplasma de *S. tuberosum* en trabajos reportados por Laferriere *et al.*, (1999) y Galván *et al.*, (2006).

R. solanacearum es una de las bacterias fitopatógenos más graves que causa la enfermedad de la marchitez bacteriana que afecta a más de 200 especies vegetales (CIP, 2007). Sus hospederos incluyen plantas económicamente importantes, tales como la papa (*S. tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), plátano (*Musa acuminata*) y maní (*Arachis hypogaea*).

La marchitez bacteriana es una de las principales enfermedades en el cultivo de papa y es uno de los factores limitante para los agricultores de las regiones donde el potencial productivo está condicionado, fundamentalmente por problemas bióticos como en África y

ciertas regiones de Asia (FAO, 2008). Además, es considerada la segunda en importancia económica del cultivo de papa después del tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*. Afecta 1,5 millones de hectáreas por año en alrededor de 80 países en todas las latitudes y regiones. Los perjuicios económicos son aproximadamente de USD 950 millones por año (Walker y Collion, 1998; Champoiseau *et al.*, 2009; Muthoni *et al.*, 2013).

El inóculo inicial se encuentra principalmente en el tubérculo semilla de papa o en el suelo. Cuando la enfermedad comienza a partir de la infección del tubérculo semilla, el patógeno se traslada desde éste al resto de la planta por el xilema, y cuando se origina desde el suelo, el patógeno ingresa por las raíces secundarias o heridas causados por el manejo (Genin, 2010).

El patógeno invade el sistema vascular y coloniza el xilema. Los factores de virulencia para *R. solanacearum* son exopolisacáridos (EPS) y enzimas que degradan la pared celular (Cell Wall Degrading Enzymes, CWDE) (Clough *et al.*, 1997; Flavier *et al.*, 1997; Schell 2000). Los EPS se producen en abundancia y provocan el marchitamiento de la planta mediante la restricción de flujo de agua a través de los vasos del xilema. Las CWDE generan la virulencia facilitando inicialmente la invasión y colonización vascular (Saile *et al.*, 1997).

Se considera que las colonias bacterianas son comunidades sociales que integran las señales intercelulares con el fin de coordinar la expresión de genes en beneficio de la colonia. Las bacterias son capaces de censar la densidad de su población a través de un sistema de comunicación célula-célula, denominado "quorum sensing" (QS). Este sistema regula la expresión génica en respuesta a la densidad celular mediante la producción constante y la detección de moléculas de señalización (Helman y Chernin, 2015).

La expresión de los factores de virulencia se producen de una manera que dependen de la densidad de población celular y se convierten de un fenotipo móvil que no genera virulencia a un fenotipo adaptado a un estilo de vida parásito de las plantas no móvil que es virulento (Clough *et al.*, 1997; Flavier *et al.*, 1997).

Estas enfermedades vasculares ocasionan marchitamiento de las hojas y parte aérea de la planta, lo que puede conducir a un deterioro de toda la planta y, finalmente, a la muerte vegetal. Si bien el floema es rico en azúcares, la mayoría de los patógenos vasculares probablemente se han especializado competitivamente en nichos específicos colonizando los vasos del xilema que son pobres en nutrientes y más ricos en agua (Yadeta y Thomma, 2013).

Hasta el momento, no ha sido reportada ninguna variedad comercial ni germoplasma con inmunidad o resistencia a la infección en el tubérculo. Con el propósito de disminuir la fuente de inóculo inicial el uso de semilla certificada es fundamental, ya que cuenta con análisis sanitario de laboratorio (INASE, 2015).

El principal efecto negativo del uso de semilla infectada es debido a que una vez que ingresa el patógeno al suelo -campo- puede permanecer latente durante años, asociado a especies malezas o silvestres hospederas, restos vegetales y cursos de agua. Por lo tanto, el campo además de perjudicar el cultivo actual, queda improductivo para futuros cultivos porque restringe las opciones productivas en solanáceas y otros cultivos hospederos (Wenneker *et al.*, 1999; Hayward, 1991).

3.3.2. Percepción del patógeno y respuestas de resistencia

Las plantas en general son resistentes a la mayoría de los microorganismos, incluidos los fitopatógenos lo que se denomina “Resistencia del no hospedero”. Esta resistencia considera que no hay interacción entre el patógeno y la planta. La protección contra los patógenos, que no se especializan en atacar una serie determinada, es generada por diferentes mecanismos: capas cuticulares, ceras preformadas, compuestos antimicrobianos y respuestas inducidas (Jones y Dangl, 2006).

Los microbios asociados al vegetal pueden ser patógenos que deterioran el crecimiento vegetal y la reproducción. Las plantas responden a la infección utilizando un sistema inmune que puede dividirse en dos modos de percepción. El primero es denominado Inmunidad Inducida por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), o PTI por su sigla en inglés, el cual reconoce y responde a moléculas comunes a muchas clases de microbios, incluidos los no patógenos (Jones y Dangl, 2006).

En la coevolución de las interacciones huésped-microbio, los patógenos han adquirido la capacidad de suministrar proteínas efectoras a la célula vegetal para suprimir la respuesta PTI, lo que ha permitido el crecimiento de los patógenos y las enfermedades. El segundo mecanismo responde a éstos factores de virulencia de los patógenos, dónde las plantas expresan proteínas de vigilancia (R) para controlar directa o indirectamente la presencia de las proteínas efectoras del patógeno. Esta resistencia se denomina Inmunidad Inducida por

Efectores (ETI, por su sigla en inglés) (Jones y Dangl, 2006). Mientras que la PTI es activada a partir del reconocimiento de PAMP conservados en patógenos, la ETI es activada a partir del reconocimiento de las proteínas efectoras secretadas (Yadeta y Thomma, 2013).

Los PAMP son estructuras muy conservadas presentes en los microorganismos, con la característica de que son indispensables para la vida del patógeno y no están presentes en el hospedero, lo cual le permite a la planta reconocerlos como extraños y desarrollar los mecanismos de defensa (Zipfel *et al.*, 2006).

Chisholm *et al* (2006) describieron que el reconocimiento vegetal a los PAMP bacterianos desencadenan una reacción en cadena de MAP quinasas (MAPK) y la reprogramación transcripcional mediada por factores de transcripción WRKY de la planta. A su vez, las bacterias patógenas utilizan el sistema de secreción de tipo III para liberar proteínas efectoras, que se dirigen a múltiples proteínas del huésped con el fin de suprimir la respuesta PTI, lo que permite una acumulación significativa de bacterias en el apoplasto de la planta. Las Proteínas R de la planta reconocen la actividad efectora y restauran la resistencia a través de las respuestas ETI.

Jones y Dangl (2006) reportaron la interacción planta-patógeno en 4 fases: (1) las plantas detectan patrones moleculares asociados a patógenos o microbios -PAMP o MAMP- mediante Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR) para activar la PTI. En la fase 2, los patógenos exitosos presentan la capacidad de liberar efectores que interfieren con la PTI, o de otra manera permiten la nutrición y la dispersión de patógenos en el vegetal, lo que resulta en la susceptibilidad activadas por efectores (ETS). En la fase 3, un efector es reconocido por una proteína R (NB-LRR), lo cual desencadena la ETI. Es una respuesta similar a PTI pero más amplificada que puede inducir la muerte celular por hipersensibilidad (HR). En la fase 4, puede ser que el patógeno haya perdido el efector o tal vez adquirido nuevos efectores a través de flujo horizontal de genes y estos pueden ayudar a los agentes patógenos para reprimir ETI, por lo tanto, genera nuevamente la enfermedad.

En consecuencia, la falta de capacidad para percibir la presencia del patógeno por parte del vegetal ocasiona que la infección sea exitosa y la susceptibilidad de la planta lleva a que exista la enfermedad (Zipfel *et al*, 2006; Lacombe *et al*, 2010; Yadeta y Thomma, 2013)

PTI es la primera defensa que posee la planta ante la presencia de un agente patogénico. Los PRR son los primeros en actuar, denominados mecanismos de percepción

“muy tempranos”, desencadenando respuestas como: a) alteraciones en la pared celular, b) flujo de iones H^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, lo que involucra el ingreso de calcio al citoplasma celular, c) la acumulación de quitinasas, glucanasas y proteasas, proteínas relacionadas a la defensa, que detienen el proceso de colonización del patógeno, y d) fundamentalmente desarrollan un rápido aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), esto es de notoria importancia en la respuesta de defensa vegetal por su acción antibiótica (Boller y Felix, 2009).

FLS2 de *Arabidopsis thaliana* es un PRR con la capacidad de reconocer una zona N terminal conservada (flg22) de la flagelina (Felix *et al.*, 1999). Por otra parte, el receptor EFR por sus siglas en inglés Elongation Factor Tu Receptor (EFR) de *A. thaliana* reconoce el factor de elongación Tu (EF-Tu), que ha sido descrito en especies de las familias de las crucíferas (Kunze *et al.*, 2004). El péptido elf18 es la zona conservada del EF-Tu que es reconocida por el receptor EFR y que desencadena cambios en los mismo genes que el receptor de la flagelina FLS2 (Zipfel *et al.*, 2006).

La flagelina y el EF-Tu tienen la capacidad de desencadenar el mismo conjunto de acciones, contribuyendo como respuesta rápida de defensa en la planta (Zipfel *et al.*, 2006). Se ha mostrado que la transferencia de EFR mediante ingeniería genética en tabaco y tomate permite el reconocimiento de EF-Tu y por lo tanto, potenciando la resistencia contra una gama de patógenos bacterianos, incluyendo *R. solanacearum*. Se espera que este tipo de resistencia de amplia gama sea durable (Lacombe *et al.*, 2010).

El reconocimiento de los vegetales a patógenos vasculares mediante cualquiera de los receptores conduce a la activación de las respuestas de defensa en los vasos del xilema. Estos comprenden las respuestas de defensa física que contienen al patógeno en los vasos del xilema, y las respuestas de defensa químicas que matan o inhiben el crecimiento del patógeno, como la alcalinización extracelular que se produce como consecuencia del flujo de iones a través de la membrana plasmática. La activación de las MAP quinasas que desencadenan las respuestas celulares y las señales relacionadas con la herida (Zipfel *et al.*, 2006).

Otro mecanismo de defensa común en los vasos del xilema contra patógenos vasculares es la formación de tílides (Beckman, 1964; Talboys, 1972; Rahman *et al.*, 1999; Fradin y Thomma, 2006). Los Tílides son excrecencias de las células del parénquima asociadas con los vasos que sobresalen y bloquean la propagación y dispersión de los agentes

patogénicos. Se forman más rápidamente en plantas resistentes que en plantas sensibles (Beckman, 1964; Talboys, 1972; Grimault *et al.*, 1994; Agrios, 2005).

Una respuesta de defensa física observada durante la colonización del xilema es el recubrimiento vascular. Se forma rápidamente una capa en la zona de la pared vascular alrededor de la infección inicial y de los vasos del xilema adyacentes. Por otra parte, se descubrió que la respuesta de defensa de deposición de callosa e inflamación de las paredes primarias de los vasos del xilema se dio durante la infección de *R. solanacearum* en pimientos resistentes. Esta deposición de altos niveles de callosa en los cultivares resistentes alrededor de las células infectadas inicialmente podría inhibir a los patógenos de mayor propagación (Beckman *et al.*, 1982; Rahman *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2008).

Los cambios metabólicos de la respuesta de defensa vegetal conducen a la acumulación de diferentes proteínas y metabolitos secundarios en la savia del xilema. Entre las proteínas y los metabolitos secundarios se encuentran: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, peroxidasas, proteasas, xiloglucano-endotransglucosilasa (XET) y xiloglucano compuestos específicos de la proteína inhibidor de endoglucanasa (XEGIP), fenoles, fitoalexinas, y lignina (Yadeta y Thomma, 2013).

Las peroxidasas se conocen que están involucradas en la producción de ROS a través de su actividad enzimática y estas sustancias son compuestos tóxicos que pueden eliminar patógenos a nivel vascular. Además, están implicadas en la polimerización de compuestos de la pared celular, lignina y súber; que participan en la biosíntesis y regulación de los niveles de peróxido de hidrógeno, que todos tienen la capacidad de contribuir en la defensa vegetal (Hilaire *et al.*, 2001; Passardi *et al.*, 2005).

3.3.3. Mejoramiento genético

La marchitez bacteriana es una de las enfermedades más difíciles de controlar debido a la falta de tratamientos curativos, la gran diversidad genética del patógeno, la capacidad de sobrevivencia a distintas condiciones climáticas, los diversos mecanismos de diseminación, persistencia y de patogenicidad (Saddler, 2005). Dada la baja efectividad en el control de la enfermedad en el manejo del cultivo, los esfuerzos están dirigidos hacia el mejoramiento genético (González *et al.*, 2013).

El fito-mejoramiento comprende la alteración de características heredables de las plantas para obtener cultivares (variedades o híbridos) avanzados genéticamente adaptados a condiciones específicas, de mayores rendimientos económicos y de mejor calidad productiva (Vallejo y Estrada, 2002).

El mejoramiento genético convencional consta de la hibridación y selección en sucesivas instancias con el propósito de fijar las características deseadas. El género *Solanum* posee una gran limitante para aprovechar la totalidad de los alelos entre las distintas especies que es su desbalance endospérmico; además, de los diferentes niveles de ploidía. Por lo tanto, el éxito en los cruzamientos, cuando no intervienen barreras pre-cigóticas, estará dado por la compatibilidad en el Número de Balance Endospérmico (EBN) de las especies utilizadas. El EBN se refiere al valor asignado al endosperma de cada especie, y puede ser 1, 2 o 4 (Johnston *et al.*, 1980; Johnston y Hanneman, 1982).

El uso de cmm en el mejoramiento genético de *S. tuberosum* está limitada por la barrera a la hibridación post-cigótica entre las especies, cmm ($2n=2x=24$, 1 EBN) y *S. tuberosum* ($2n=4x=48$, 4EBN). Sin embargo, es posible con ciertas limitantes y en condiciones controladas, obtener progenie viable al cruzar especies del género *Solanum* con similar EBN, es decir, cruzamientos entre especies de 1-2 y 2-4 EBN. Por lo tanto, para introducir los genes de resistencia de cmm en *S. tuberosum* es necesario realizar un cruzamiento puente con *S. phureja* ($2n=x=2x=24$, 2EBN), que puede cruzarse forzosamente tanto con cmm y como con *S. tuberosum*. Finalmente, los genes de resistencia de cmm fueron transferidos en el cruzamiento con *S. phureja* y este híbrido fue cruzado con *S. tuberosum* para incorporar en esta especie dicho genes (González *et al.*, 2013).

INIA en colaboración con Facultad de Agronomía comenzaron a principios de los 2000 la incorporación de especies emparentadas como cmm con genes de resistencia a *R. solanacearum* en el banco de germoplasma de papa (González *et al.*, 2013; Narancio *et al.*, 2013). Sin embargo, pese al esfuerzo actualmente no existe en el Registro Nacional de Cultivares un cultivar que presente resistencia a este patógeno (INASE, 2016).

La ingeniería genética y del desarrollo de OGM es una herramienta que se puede utilizar dentro del programa de mejoramiento genético de una especie, con el principal cometido de utilizar genes que se encuentran más alejados evolutivamente de la especie de interés y donde se constatan barreras físicas a su incorporación por técnicas convencionales de

mejoramiento. Por lo tanto, se puede ampliar el rango de genes disponibles en el mejoramiento genético (Dalla Rizza, 2015).

La bacteria *A. tumefaciens* causa agalla de la corona en muchas especies de plantas mediante un proceso de infección, se basa en la transferencia e integración de una parte de su ADN en el genoma de su huésped (Escobar y Dandekar, 2003). Esta propiedad ha sido ampliamente utilizada para introducir genes de interés en plantas (Gelvin, 2003). Lo que ha llevado a una amplia investigación sobre los procesos en los cuales *Agrobacterium* transfiere su T-ADN y la expresión génica en sus células huésped. La ingeniería genética obtuvo gran relevancia en el mejoramiento genético vegetal a partir de este descubrimiento y la manipulación de esta técnica.

El objetivo general del trabajo fue contribuir al desarrollo de cultivares de papa con resistencia a *R. solanacearum*, combinando estrategias de mejoramiento genético e implementando protocolos de Bioseguridad en laboratorio e invernáculo.

Los objetivos específicos son:

- 1) Caracterizar molecular y funcionalmente los genotipos transformados.
- 2) Evaluar genotipos de papa transformados para su respuesta a *R. solanacearum*.

Las hipótesis de trabajo son:

- 1) Los genotipos de papa transformados por *Agrobacterium* presentan el inserto.
- 2) Los genotipos de papa transformados expresan la proteína EFR.
- 3) La proteína EFR es funcional en los genotipos de papa transformados.
- 4) Los genotipos de papa transformados presentan respuesta diferencial a *R. solanacearum*.
- 5) El receptor EFR desencadena la respuesta de PTI en papa y genera resistencia adicional a *R. solanacearum*.
- 6) Es posible diferenciar el efecto de la base genética de los genotipos y los debidos al proceso de transformación.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Material vegetal

En 2013 el INIA en colaboración con The Sainsbury Laboratory (TLS) se enviaron a Inglaterra para transformar plantas in vitro del cultivar INIA Iporá y del clon de mejoramiento 09509.6. La transformación se realizó mediante la técnica de Ingeniería genética con el vector biológico de *A. tumefaciens* con el promotor CaMV35s del virus del mosaico del coliflor, la zona codificante EFR de *A. thaliana* y el terminador NOS. Además, se agregó el marcador de selección de resistencia a Kanamicina con el promotor NOS, la zona codificante ntpII y terminador NOS.

Se utilizaron 10 líneas del cultivar INIA Iporá y 10 líneas del clon de mejoramiento 09509.6 transgénicas EFR enviadas a Uruguay de TLS en enero de 2015. Los controles utilizados fueron el cultivar INIA Iporá (sin transformar), como referencia de control negativo porque es muy susceptible a *R. solanacearum* y el Clon 09509.6 sin transformar que es una línea proveniente del programa de mejoramiento genético de INIA que presenta resistencia parcial a *R. solanacearum* (González *et al.*, 2013).

Como testigos de referencia se emplearon las líneas 13001-41 y 13001-50 que son retro-cruzas descendientes de cruzamientos entre cmm y *S. tuberosum* que presentan cierto grado de resistencia a *R. solanacearum*. También se utilizó la accesión de cmm 0402.3 perteneciente al banco de germoplasma de papa del INIA.

3.4.2. Presencia del transgén EFR

La detección del inserto fue realizada mediante PCR. La extracción de ADN se realizó con el Kit comercial de Zymo Research a partir de hojas de las 10 líneas correspondientes al clon-EFR, 10 líneas de INIA Iporá-EFR, y los testigos sin transformar. La concentración de ADN de cada muestra se estimó mediante lecturas de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro Nanodrop 8000.

El mix de reacción utilizado fue PCR Buffer 1x, MgCl₂ 2,5 μM, dTNPs 0.5 μM, Primers 0.4 μM y Taq polimerasa 1 U (Invitrogen) 1.5 μl de ADN en un volumen final de 20 μl. Los

primers EFR1-Fw (5`CCA GTT TAG TTC TGC TGG TGT CA 3`) y EFR1-Rv (5`GTT GGCCTC CCA TTC CAT ACT 3`) fueron sintetizados por Macrogen (Corea del Sur). El ciclado para la PCR fue de 94 °C durante 3min, 94 °C durante 30seg, 60 °C por 40seg, y 72 °C durante 40seg repetido 35 veces; y como paso final 72 °C por 2min,. Las bandas fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % conteniendo GoodView (SBS Genetech) y visualizadas en transiluminador UV. En cada gel se empleó el marcador de peso molecular Hyperladder 100 (Thermo scientific) para corroborar el tamaño de los productos de amplificación obtenidos.

3.4.3. Número de copias del gen EFR

El número de copias de cada evento de transformación se estudió mediante la cuantificación relativa por PCR en tiempo real. Para ello, se amplificó y cuantificó en cada línea el gen UDP-glucosa pirfosforilasa (UGPasa), presente en copia única en el genoma de la papa (Protocol EH92-527-1, JRC-CRL), y el gen EFR en todas las líneas analizadas. La cuantificación relativa del número de copias se obtuvo realizando el cociente entre el número de copias totales del gen EFR y el número de copias totales del gen de la UGPasa.

El ADN utilizado fue una alícuota del utilizado para la PCR tiempo final. Las curvas estándar preparadas para cada uno de los genes de todos los tratamientos del cultivar INIA Iporá-EFR y Clon 09509.6-EFR, se ajustaron en base a una línea transgénica donde se detectó la presencia del gen por PCR convencional. Se realizaron diluciones seriadas de 1/10 y se amplificaron por triplicado por PCR.

La reacción de PCR a tiempo real se realizó en un termociclador ABI 7500 Applied Biosystem (USA). La reacción de PCR se realizó agregando TaqMan® Master Mix (Applied Biosystem) 1X, 200 nM de cada primer y 100 nM de cada sonda marcada fluorescentemente, 100 ng de ADN y agua ultrapura, para completar un volumen final de 25 µL. Los primers y sondas utilizadas se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Primers y sondas utilizadas para la determinación del número de copias por Real Time PCR:

Nombre primers/sonda	Secuencia (5' - 3')
EFR-Fw	CCA GTT TAG TTC TGC TGG TGT CA
EFR-Rv	GTT GGC CTC CCA TTC CAT ACT
EFR-Pr	6-FAM- CCA TTG GCT ATG CCG CGC CA- TAMRA
UDP-Fw	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC
UDP-Rv	CCT ACC TCT ACC CCT CCG C
UDP-Pr	6-FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA

Las eficiencias de reacción obtenidas para las curvas estándar de las líneas INIA Iporá fueron de 98 % y 88 %, para el gen EFR y el gen de la UGPasa, respectivamente. Para los Clones 09509.6 fueron de 94 % y 83 %, para el gen EFR y el gen de la UGPasa, respectivamente. Se utilizaron las muestras control del cultivar INIA Iporá y el Clon 09509.6 sin transformar como testigos negativos.

3.4.4. Expresión proteica

La presencia o ausencia de la proteína EFR en las distintas líneas estudiadas se analizó mediante la técnica de Western Blot. La metodología consiste en primer lugar en la extracción de proteínas totales, su posterior separación en base a su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida, y su transferencia a una membrana de PVDF (por su nombre en inglés "*Polyvinylidene difluoride*") mediante la aplicación de un campo eléctrico. La proteína de interés es entonces detectada por el reconocimiento con anticuerpos específicos conjugados a peroxidasa, y la reacción de ésta con sustratos quimioluminiscentes sobre films fotosensibles.

El extracto proteico se realizó a partir de hojas de plantines de dos semanas para las 20 líneas transformadas y los dos controles sin transformar. Se cortaron tres discos de hoja con sacabocado N°4 y se congelaron con nitrógeno líquido. Posteriormente, se agregó Sample Buffer (β -mercaptoetanol 6 %, SDS 2.5 %, Glicerol 50 %, Buffer Tris HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1 mg/ml). La muestra se molió y los extractos se incubaron a 95 °C durante 5 minutos.

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 8 %, a 90 V durante 1 hora. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF previamente activadas con metanol, equilibradas en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y etanol al 20 %) durante 1 hora a 100 V en un equipo BioRad de transferencia húmeda. Luego de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con PBS y BSA 3 % durante 16 h a 4 °C.

La proteína EFR tiene un peso esperado de 140 KDa y contiene asimismo el epítotope HA para su detección mediante la utilización de anticuerpos específicos contra HA. Después de realizada la transferencia se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.2 % y se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-HA de rata 50 ng/ul (Roche) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de tres lavados se incubó con un anticuerpo anti rata-peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluido 1 en 2000 durante 1 hora a temperatura ambiente y las membranas fueron lavadas nuevamente con PBS-Tween 0.2 % tres veces.

La presencia del complejo EFR-anticuerpo-peroxidasa se detectó con el reactivo Supersignal West Femto Kit (Thermo Scientific, USA) el cual es un sustrato quimioluminiscente para esta enzima. La quimioluminiscencia se evidenció mediante exposición con un film fotosensible (Biomax ligh film Sigma-Aldrich) detectando así presencia o no de peroxidasa y por lo tanto, si la proteína EFR está presente.

3.4.5. Funcionalidad proteica

La funcionalidad del receptor EFR se analizó mediante el estudio de la producción de especies reactivas al Oxígeno (ROS) como respuesta al reconocimiento de su ligando mínimo elf18. Para ello se seleccionaron muestras de hoja de 4 mm de diámetro (sacabocados N°4) de plantas de 4 semanas, las que se colocaron individualmente en placas Greiner blancas de 96 pocillos con 150 µL de agua destilada y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. En una misma placa se analizaron las 10 líneas transformadas de cada genotipo, su muestra control sin transformar y el blanco sin hoja, en cuatro repeticiones de cada una.

Al día siguiente se descartó el agua y se agregó 100 µL de la solución de ensayo a cada pocillo conteniendo: Luminol 100 µM, HRP (horseradish peroxidase) 100 µg.mL⁻¹, péptido elf18 100 nM y agua c.s.p. 10 ml. Se midió la luminiscencia inmediatamente después en un

equipo Varioskan. La emisión lumínica se midió en cada celda durante 0.4 s cada 60 s y una duración total de la placa de 80 minutos.

Lo que se observó fue la emisión lumínica en cada pocillo y se realizó una gráfica de cada línea, que ilustró la funcionalidad de la proteína EFR con el péptido elf18 (Lacombe *et al.*, 2010).

3.4.6. Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano

Se realizó en condiciones de bioseguridad en la cámara de crecimiento de Facultad de Agronomía en el Centro Regional Sur (CRS). Estas instalaciones fueron habilitadas previamente por la Comisión para la Gestión del Riesgo de OGM para el manejo de plantas transgénicas. Para la determinación de la resistencia a la marchitez bacteriana se realizaron dos ensayos de 28 días de duración cada uno, entre los meses de abril y agosto de 2015.

Los ensayos se realizaron en almacigueras de 88 celdas, con un volumen de 17 cm³ por celda y 4 g de sustrato hortícola comercial libre de patógenos. El trasplante de las plantas in vitro a las almacigueras se realizó en dos tiempos: a) para el primer ensayo se trasplantaron el 9 de abril de 2015, se introdujeron en la cámara de crecimiento el 27 de abril y se inocularon el 28 de abril, y b) para el segundo ensayo, el trasplante se realizó el 21 de junio, se introdujeron en la cámara de crecimiento el 7 de julio y se inocularon el 9 de julio. En ambos ensayos las plantas permanecieron en la cámara durante 28 días. Las condiciones ambientales fueron 28 °C de temperatura y un fotoperiodo de 12 h con luz artificial.

En ambos ensayos se analizaron 16 plantas de cada tratamiento por parcela. El diseño fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones y se siguió la metodología desarrollada por González *et al.* (2013) que permite diferenciar grados de resistencia a la enfermedad.

La inoculación se realizó en el suelo con 1 ml de inóculo y rotura de raíz, basada en Montanelli *et al.* (1995) citado por González *et al.* (2013), Narancio *et al.* (2013). Para la preparación del inóculo se utilizó la cepa UY031 de la bacteria *R. Solanacearum*, perteneciente al filotipo IIB, secuevar 1 (raza 3 biovar 2) de alta agresividad en papa (Siri *et al.*, 2011). El inóculo se preparó como una suspensión de bacterias en suero fisiológico, a una concentración de 1 x 10⁷ ufc·mL⁻¹ (2.5 x 10⁶ /gr de suelo). Se partió de colonias incubadas en placas de Petri

durante 48 horas a 28 °C en medio de crecimiento Kelman conteniendo cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) (González *et al.*, 2013).

Los tratamientos estudiados fueron 25: a) 10 líneas del clon 09509.6-EFR, b) 10 líneas de INIA Iporá-EFR, c) clon 09509.6-S/T (sin transformar), d) INIA Iporá-S/T, y e) los clones de referencia 13001-41, 13001-50 y la accesión 0402.3.

El nivel de enfermedad se evaluó en base a una escala arbitraria de 0 a 4, donde 0 es la ausencia de síntomas hasta 4 que es la planta muerta. Las mediciones se realizaron cada 7 días, por lo tanto, en cada ensayo se obtuvieron cuatro evaluaciones.

Se realizó la curva del Índice de enfermedad en función del tiempo para cada tratamiento y la variable dependiente utilizada fue el área bajo la curva de la enfermedad (AUDPC).

El AUDPC se calculó como la integral del índice de enfermedad de cada tratamiento en el gráfico que relaciona el nivel de enfermedad vs el tiempo. El índice de la enfermedad que se registró cada 7 días se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$IE = \sum_{i=0-4} (\sum^n p_i \times n_i) =$$

n= número de plantas

i= nivel de enfermedad

p= plantas

Los análisis estadísticos realizados fueron: a) análisis de varianza para corroborar la significancia entre tratamientos, entre bases genética y entre la presencia o no del transgén EFR, b) estudio de contrastes por Scheffé para diferenciar grupos, y c) test de Tukey para el análisis entre tratamientos.

El modelo utilizado fue $Y = BG + T + BG*T + EE$

BG= Base genética (INIA Iporá o clon 09509.6)

T= Transgén (EFR o No EFR)

EE= Error Experimental

3.4.7. Determinación de la presencia de *R. solanacearum* en infección latente en tallo

La presencia de la bacteria en las plantas se determinó mediante BIO-multiplex PCR desarrollada por Ferreira *et al.*, (2015). La detección se realizó sobre una porción de la base del tallo de las plantas que no mostraron síntomas de marchitamiento luego de los 28 días posteriores a la inoculación, en las cuatro repeticiones de los dos ensayos realizados.

Se cortaron 2 cm de tallo por encima del suelo, se lavaron con agua, se secaron con papel absorbente y se pesaron los tallos por tratamiento y por repetición. Posteriormente se desinfectó superficialmente con EtOH 70 % o hipoclorito al 1 % (1 min) y se lavó con agua destilada estéril (1 min) bajo cámara de flujo laminar. Al final se colocaron los fragmentos de tallo en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml, se agregó 1 ml de buffer de extracción y se trituró para obtener el extracto.

Se realizó una etapa de enriquecimiento selectivo para aumentar la cantidad de células del patógeno y separar sustancias inhibitoras presentes en las muestras vegetales que pueden bajar la eficiencia de la amplificación.

Alícuotas de 0.1 ml del extracto de cada muestra se sembraron en tres placas de medio selectivo mSMSA. Se incubó en estufa a 28°C durante 48 h, se lavaron dos de las tres placas con 2 ml de agua estéril y se rastrillaron con ansa para desprender las colonias en crecimiento.

El lavado de ambas placas se recolectó en un mismo tubo estéril y se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min/ 8000 rpm. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en 0,1 ml de suero fisiológico estéril, para finalmente lisar las células por calentamiento durante 20 min a 99 °C.

La tercera placa se continuó incubando en el medio selectivo a 28°C para observar el desarrollo de colonias típicas de *R. solanacearum* y poder realizar el recuento de colonias.

La reacción se basa en el uso simultáneo de un par de primers generales para la especie (Opina *et al.*, 1997) (Cuadro 2) y primers específicos para cepas de *R. solanacearum* IIB-1 (Ferreira *et al.*, 2015). Por último, se realizó la reacción de multiplex PCR a partir del lisado, con el mix PCR y el ciclado descritos en los Cuadros 3 y 4 respectivamente. Esto permitió detectar a todas las cepas de *R. solanacearum* e identificar aquellas pertenecientes al filotipo IIB y secuevar 1 (IIB1).

Cuadro 2. Primers utilizados en la Bio-multiplex PCR

Primer	Secuencia
759 (Opina <i>et al.</i> , 1997)	GTCGCCGTCAAC TCACTT TCC
760 (Opina <i>et al.</i> , 1997)	GTCGCCGTGTCAGCAATGCCGAATCG
00878Fw	TAGAGCCACTGCTGCTGAGA
00878Rv	TACCTCCGTGCTTACCATCC
02103Fw	ATTGCCCACTACTTGGAAACG
02103Rv	AACTACGAGGGTGGTTGCAG

Cuadro 3. PCR Mix

Reactivo	Conc. Stock	Vol x1 (μ l)	Conc. Final
Buffer Taq	10x	2,5	1x
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	5 mM	1,0	0,2 mM
759	10 μ M	1,0	0,4 μ M
760	10 μ M	1,0	0,4 μ M
00878F	10 μ M	1,0	0,4 μ M
00878R	10 μ M	1,0	0,4 μ M
02103F	10 μ M	1,0	0,4 μ M
02103R	10 μ M	1,0	0,4 μ M
Taq	5 U/ μ l	0,3	1,5 U
H ₂ O	-	9,45	-
ADN o lisado	-	5,0	-
Volumen total	-	25,0	-

Cuadro 4. Ciclo de la PCR

T (°C)	96	94	60	72	72	4
Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	45 seg	10 min	20 min
Repeticiones	1	40			1	1

Las variables estudiadas fueron la presencia o ausencia de *R. solanacearum* en tallo y el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por ml de extracto en placa.

3.4.8. Determinación de la presencia de *R. solanacearum* en infección latente en tubérculo

La evaluación de la infección latente en tubérculo se realizó por PCR en cuatro líneas de INIA Iporá-EFR: 3, 12, 16 y 27 y cuatro líneas del Clon 09509.6-EFR: 34, 37, 38 y 41

seleccionadas según la respuesta en el ensayo descrito anteriormente. Además, se analizaron los testigos de cada base genética sin transformar.

Las plantas se multiplicaron por cultivo in vitro y se trasplantaron 11 plantas de cada línea en macetas de 1 L. Se aclimataron durante un mes en condiciones de invernáculo y el 12 de abril de 2016 se trasladaron a la cámara de crecimiento del CRS, Facultad de Agronomía. Dos días después se inocularon con 130 ml con una concentración de 1×10^7 ufc/ml de la cepa UY 031 de *R. solanacearum*, (2.5×10^5 /gr de suelo). Previamente se realizó daño mecánico en raíces.

Se mantuvieron las plantas en condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la bacteria durante 14 días ($28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y 14 h de luz) y posteriormente se adecuaron las condiciones para el crecimiento y desarrollo de tubérculos ($20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y 10 h de luz). El ensayo duró 3 meses y se cosecharon los tubérculos de todas las plantas.

Los tubérculos se lavaron con agua quitando la tierra adherida a la superficie. Cada tubérculo se cortó con un bisturí previamente desinfectado y se tomó un pequeño trozo de la zona de los haces vasculares a nivel del estolón. Posteriormente se realizó la desinfección superficial por inmersión en una solución de etanol 70 % durante 1 minuto, y se realizó un lavado con agua estéril durante 1 minuto y se dejaron secar en condiciones asépticas. Los trozos correspondientes a cada muestra se juntaron en una bolsa de plástico estéril, se suspendieron en 10 ml de buffer de extracción y se maceraron durante 10 min.

Se realizó un enriquecimiento del extracto en medio selectivo SMSA durante 48 h a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y se detectó la presencia de la bacteria mediante BIO-multiplex-PCR siguiendo el mismo procedimiento que en tallo.

Se midió el porcentaje de plantas sin síntomas de la enfermedad por cada línea y de éstas, el porcentaje de plantas con tubérculos con presencia y sin presencia de *R. solanacearum* por cada línea.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Detección del transgén en las líneas de papa-EFR

La presencia del gen EFR en las líneas transformadas se evaluó mediante PCR. Como se observa en la Figuras 1 y 2, el inserto correspondiente a una banda de (760 pb) está en todas las líneas transgénicas de INIA Iporá-EFR (Imagen 1), y en las líneas 32, 34, 37, 38, 39, 40 y 41 del Clon 09509.6-EFR (Imagen 2).



Imagen 1: Detección del gen EFR en líneas de INIA Iporá-EFR y el marcador de peso molecular (MM)

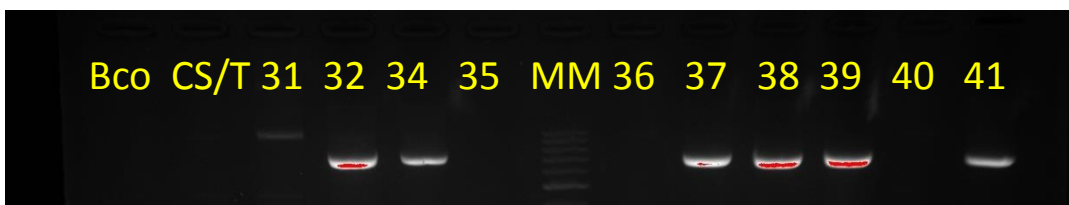


Imagen 2: Detección del gen EFR en líneas del Clon 09509.6-EFR y el marcador de peso molecular (MM)

Se repitió la amplificación y la corrida para verificar la detección del gen EFR en las líneas que dieron negativo en primera instancia Clon 09509.6-EFR 31, 35, 36, 40 e INIA Iporá-EFR 54 (Imagen 3).

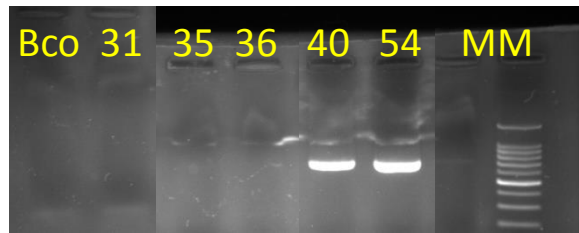


Imagen 3: Detección del gen EFR en las líneas EFR 31, 35, 36 y 40 del Clon 09509.6, línea INIA Iporá-EFR 54 y el marcador de peso molecular (MM)

En la imagen 3 se observa que en la línea INIA Iporá EFR 54 se detectó el gen EFR, por lo cual, se puede afirmar que el gen EFR está presente en todas las líneas estudiadas de INIA Iporá-EFR. Sin embargo, para el Clon 09509.6 se confirmó la presencia del gen EFR únicamente para la línea EFR 40; y que no está presente en las líneas 31, 35 y 36.

Debido a que las plantas de las líneas del Clon 09509.6-EFR: 31, 35 y 36, en las que no se detectó la presencia del gen EFR, pasaron por el proceso de transformación y sobrevivieron al marcador de selección se verificó la presencia del promotor CaM35s y el terminador T-Nos. La presencia o ausencia de estos elementos reguladores fue determinada mediante PCR, utilizando los primers específicos. Se introdujo como testigo positivo el clon 38.

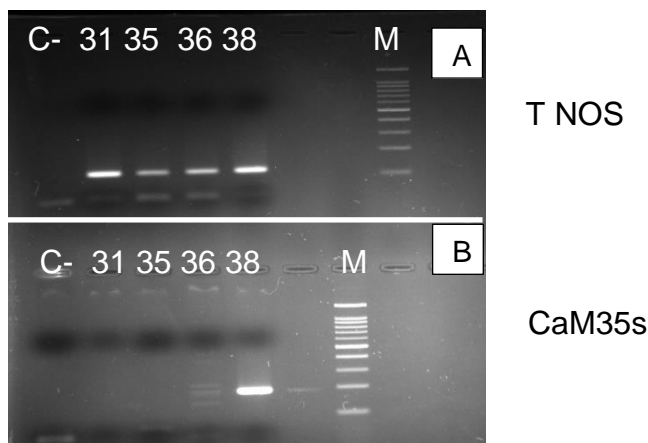


Imagen 4. Determinación por PCR de la presencia del promotor CaM35s y el terminador T-Nos en las líneas del Clon 09509.6 EFR: 31, 35 y 36, y el Clon 38 como testigo.

Se observa, en la imagen 4 A, que las líneas 31, 35 y 36 presentan el terminador T-nos. Por lo tanto, durante el proceso de transformación es probable que el inserto esté en estas

líneas en forma fragmentada y permanezca la región de marcadores de selección explicando que sobreviviera a la etapa de selección por resistencia a antibiótico. Ninguna de las tres líneas presentaría en forma completa el promotor CaM35s (Imagen 4 B) ni el gen EFR (Imagen 3).

3.5.2. Determinación del número de copias del gen EFR

El número de copias del gen EFR determinado por PCR en tiempo real mostró diferencias entre las bases genéticas y se detalla en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Número de copias del gen EFR en las líneas de INIA Iporá, el Clon 09509.6 y los respectivos testigos sin transformar

Líneas	Nº de copias gen EFR	Líneas	Nº de copias gen EFR
INIA Iporá sin transformar	Control	Clon 09509.6 sin transformar	Control
INIA Iporá-EFR 2	1	Clon 09509.6-EFR 31	0
INIA Iporá-EFR 3	1	Clon 09509.6-EFR 32	1
INIA Iporá-EFR 4	1	Clon 09509.6-EFR 34	1
INIA Iporá-EFR 8	1	Clon 09509.6-EFR 35	0
INIA Iporá-EFR 11	1	Clon 09509.6-EFR 36	0
INIA Iporá-EFR 12	1	Clon 09509.6-EFR 37	3
INIA Iporá-EFR 16	4	Clon 09509.6-EFR 38	12
INIA Iporá-EFR 27	2	Clon 09509.6-EFR 39	10
INIA Iporá-EFR 53	4	Clon 09509.6-EFR 40	1
INIA Iporá-EFR 54	1	Clon 09509.6-EFR 41	3

Del Cuadro 5 podemos confirmar que en todas las líneas EFR de INIA Iporá se insertó el gen EFR en acuerdo con el resultado de la amplificación por PCR (Imagen 1). El 70 % de las líneas presentaron una única copia, la línea 27 posee dos copias (10 %) y el 20 % restante de las líneas (INIA Iporá-EFR: 16 y 53) presentan cuatro copias del gen EFR.

El número de copias determinado en el Clon 09509.6 es coherente con la presencia del gen EFR en las líneas EFR 32, 34, 37, 38, 39, 40 y 41 (70 %), y que en las líneas EFR 31, 35 y 36 (30 %) no presentan el inserto (Cuadro 5, Imágenes 2 y 3). Solamente el 30 % de las líneas presentan una sola copia (EFR 40, 34 y 32). Las líneas 37 y 41 (20 %) presentan tres copias, la línea 39 presenta 10 copias y la línea 38 presenta 12 copias (Cuadro 5).

3.5.3. Expresión de la proteína EFR

El análisis de la expresión de la proteína se realizó en hoja mediante Western Blot. En todas las líneas de INIA Iporá-EFR que presentaron el inserto se detectó la expresión de la proteína EFR (Imagen 5).

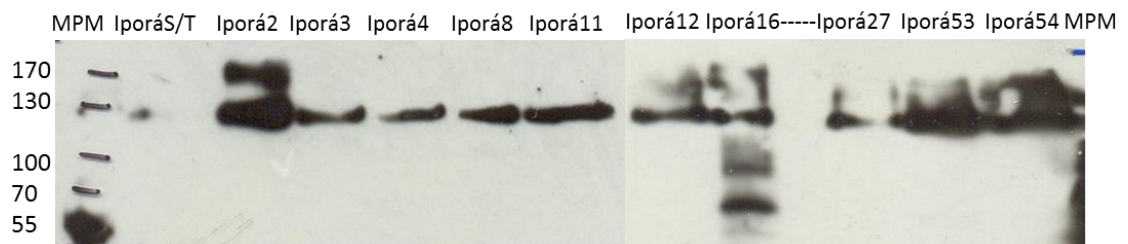


Imagen 5. Expresión de la proteína EFR en líneas INIA Iporá-EFR

Por otra parte, como se observa en la Imagen 6, las líneas del Clon 09509.6 (31, 35 y 36) que no presentaron el gen EFR no expresaron la proteína EFR. Sin embargo, las líneas 32 y 40 que presentan el gen EFR tampoco expresan la proteína EFR. Por lo tanto, solamente las líneas EFR: 34, 37, 38, 39 y 41 expresan la proteína EFR.

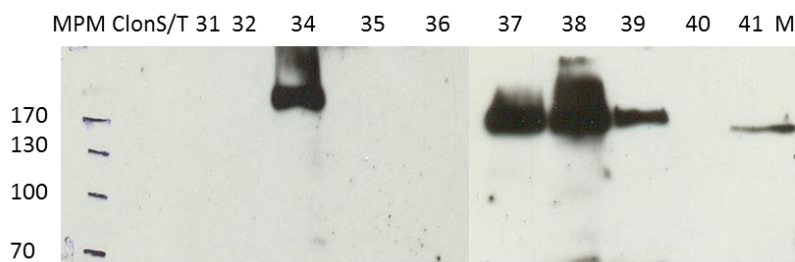


Imagen 6. Expresión de la proteína EFR en líneas del Clon 09509.6-EFR

3.5.4. Funcionalidad de la proteína

El estudio de la funcionalidad del receptor EFR se realizó mediante la detección de ROS, como respuesta al reconocimiento del péptido elf18, midiéndose la emisión lumínica en función del tiempo. Los resultados para cada línea -agrupados por base genética- se presentan

en las Imágenes 7 y 8 donde se observa el reconocimiento del péptido elf18 por el receptor EFR para cada línea. Las muestras que presentan un pico marcado de luminiscencia en el gráfico son las que expresan proteína EFR funcional al epítipo elf18.



Imagen 7. Luminiscencia expresada en RLU en función del tiempo para el análisis de ROS de las líneas de INIA Iporá-EFR

Todas las líneas de INIA Iporá transformadas presentaron expresión de la proteína EFR y reaccionaron ante la presencia del epítipo elf18 (Imagen 7)

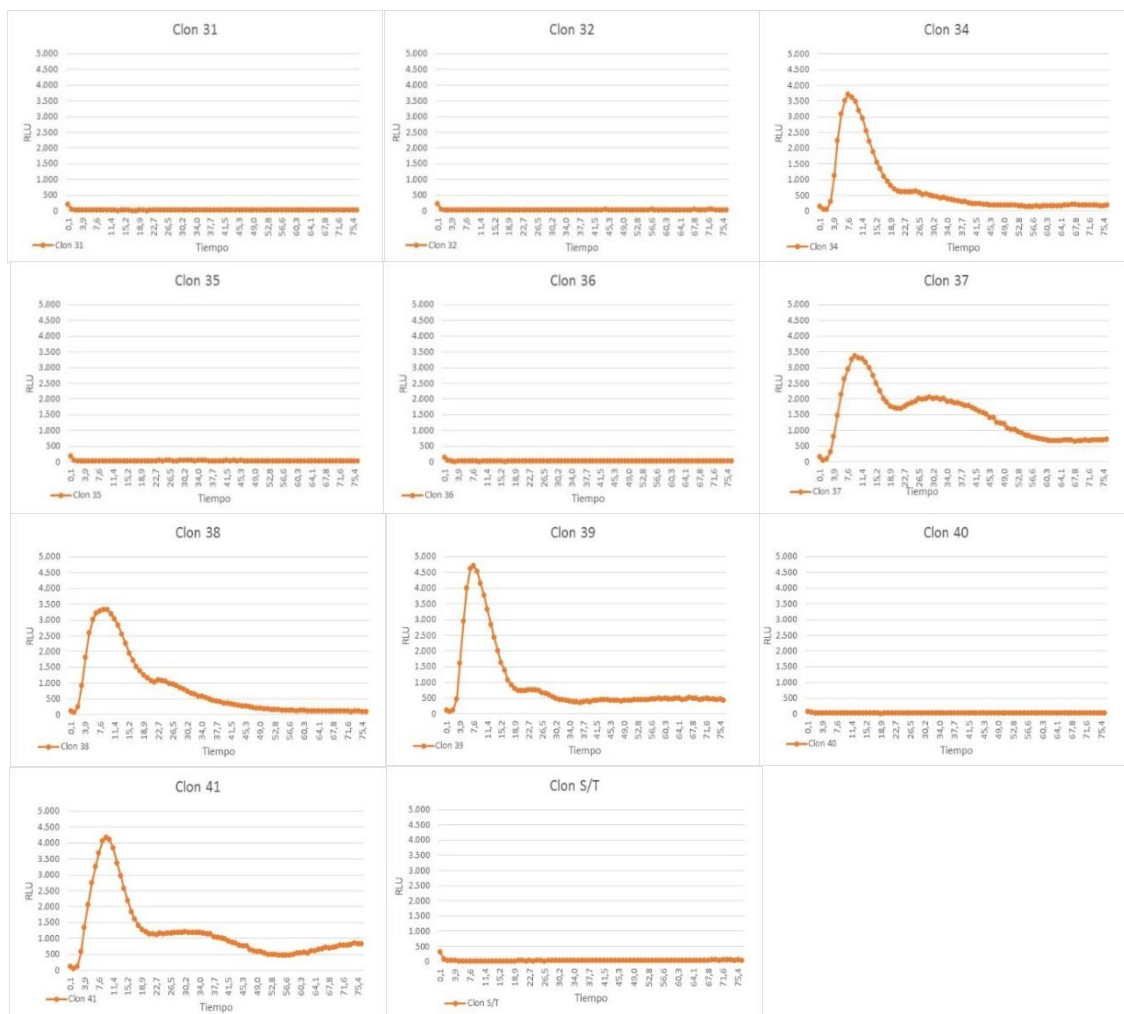


Imagen 8. Luminiscencia expresada en RLU en función del tiempo para el análisis de ROS de las líneas del Clon 09509.6-EFR

Los genotipos INIA Iporá y del clon donde se verificó la presencia del gen EFR y que expresan la proteína EFR, mostraron reaccionar ante la presencia del epítipo elf18. Por otro lado, se confirmó que las líneas donde no se detectó la presencia del gen EFR, no expresaron la proteína EFR y consecuentemente no se mostraron reactivas ante la presencia del epítipo elf18. Tampoco en las líneas 32 y 40 confirmando los resultados que indican que la proteína EFR no se expresa en estos genotipos.

3.5.5. Determinación de resistencia a *R. Solanacearum*

El primer análisis fue comparar todas las líneas evaluadas en el estudio frente a la inoculación con la bacteria. Se determinó el AUDPC de cada línea y se realizó el análisis de varianza (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de Varianza del AUDPC de todos los tratamientos en los dos ensayos analizados conjuntamente.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área bajo la curva	176	0.32	0.29	60.84

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5811.13	7	830.16	11.42	<0.0001
Base genética	1021.15	1	1021.15	14.05	0.0002
Transgén	4010.32	1	4010.32	55.19	<0.0001
Base genética*Transgén	382.13	1	382.13	5.26	0.0231
Ensayo	7.49	1	7.49	0.10	0.7485
Repetición	390.03	3	130.01	1.79	0.1512
Error	12208.50	168	72.67		
Total	18019.63	175			

Al analizar los dos ensayos de forma conjunta no existieron diferencias significativas ($p=0.7485$) entre ambos. Por lo tanto, ambos ensayos se correlacionan y generan robustez a los resultados.

Existen diferencias significativas ($p=0.0002$) entre las bases genéticas evaluadas, por lo tanto, hay un efecto en la respuesta en la resistencia a *R. solanacearum* entre las líneas de INIA Iporá y las del Clon 09509.6 y por lo tanto hay respuesta diferente según la base genética (Cuadro 6). Los valores de AUDPC variaron entre los diversos genotipos, desde 1.97 (clon 09509.6-EFR: 38) hasta 36.18 (INIA Iporá ST) correspondiendo al valor más alto de incidencia de la enfermedad.

La base genética en la respuesta a la resistencia determinó que los genotipos del Clon 09509.6 presentaran mayor resistencia a la enfermedad que los genotipos de INIA Iporá, con AUDPC media 11.6 y 16.42 respectivamente ($p<0.05$). Por lo tanto, este trabajo confirma la

presencia de genes menores que contribuyen a la resistencia frente a *R. solanacearum* en el Clon 09509.6 anteriormente reportado por González *et al.* (2013).

En el Cuadro 6 se observa que hay un efecto significativo de la presencia del transgén EFR en la resistencia ($p < 0.05$). El efecto de la presencia del inserto en respuesta a la resistencia determinó que los genotipos con el receptor EFR presentaran mayor resistencia a la enfermedad que los genotipos sin el receptor EFR y se observa en los valores medios de AUDPC resultantes de 12.5 y 29.11 respectivamente. Este comportamiento concuerda con Lacombe *et al.* (2010) observando que el receptor EFR le otorga a los genotipos respuesta diferencial con respecto al ataque de ciertas bacterias fitopatógenas, incluyendo *R. solanacearum*.

Dado que hay un efecto individual del transgén y de la base genética en la respuesta a la resistencia a *R. solanacearum*, lo importante es conocer si existe interacción entre éstos. En el Cuadro 6 se observa que la interacción entre el efecto del individual del transgén y la base genética fue significativa ($p < 0.05$).

El Clon 09509.6 y sus líneas EFR presentaron una mayor respuesta a la resistencia de la enfermedad mientras que INIA Iporá y sus líneas transformadas con el receptor EFR mostraron menor resistencia, con valores de AUDPC media de 10.56 y 36.18 respectivamente ($p < 0.05$). Las líneas de INIA Iporá-EFR y las del Clon 09509.6 sin transformar mostraron valores intermedios de AUDPC (22.04 y 14.45 respectivamente).

3.5.6. Estudio por tratamiento

Los resultados muestran que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en la respuesta a la inoculación con *R. solanacearum* entre las bases genéticas evaluadas por lo cual, el análisis se realiza de forma separada para cada genotipo.

3.5.6.1. Líneas del cultivar INIA Iporá

INIA Iporá es un cultivar obtenido en programa de mejoramiento genético de INIA, fue liberado al mercado en 1996 con características agronómicas de suma importancia para la

producción nacional, como inmunidad a virus (PVY) y alto potencial productivo, pero es susceptible al marchitamiento bacteriano (Vilaró *et al.*, 2000; Dalla Rizza *et al.*, 2006).

En el Cuadro 7 se observa la respuesta a la inoculación con *R. solanacearum* donde todas las líneas transformadas del cultivar INIA Iporá no presentaron diferencias significativas entre sí, pero resultaron significativamente diferentes del control sin transformar. Los valores de AUDPC variaron entre los diversos genotipos entre 11.10 (INIA Iporá-EFR: 27) y 36.18 (INIA Iporá ST) correspondiendo a valores más altos mayor incidencia de la enfermedad. Estos resultados de la inoculación coinciden con la caracterización molecular presentada anteriormente, sugiriendo una correlación entre el mayor nivel de resistencia observado con la expresión y funcionalidad del receptor EFR. Entre las líneas transformadas de INIA Iporá se observó cierta tendencia de mayor resistencia en las líneas 27, 3, 12, 2, 16 y 54. Esto concuerda con lo reportado por Lacombe *et al* (2010) que el receptor EFR induce la resistencia basal (PTI) de la planta una vez que reconoce al patógeno.

Cuadro 7. AUDPC media para las líneas de INIA Iporá-EFR e INIA Iporá sin transformar

Línea	AUDPC Media	
INIA Iporá EFR 27	11.10	A
INIA Iporá EFR 3	11.38	A
INIA Iporá EFR 12	11.89	A
INIA Iporá EFR 2	12.36	A
INIA Iporá EFR 16	13.21	A
INIA Iporá EFR 54	13.29	A
INIA Iporá EFR 11	15.31	A
INIA Iporá EFR 4	16.35	A
INIA Iporá EFR 53	18.13	A
INIA Iporá EFR 8	21.44	A
INIA Iporá S/T	36.18	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes Tukey ($p > 0.05$)

En la imagen 9 se observa la evolución del índice de la enfermedad de las cinco líneas de INIA Iporá-EFR con mayor potencial de resistencia a *R. solanacearum*. El nivel que alcanzan las líneas EFR es similar en todos los tratamientos y se diferencian significativamente del testigo sin transformar.

Evolución del Índice de la Enfermedad en Líneas de INIA Iporá

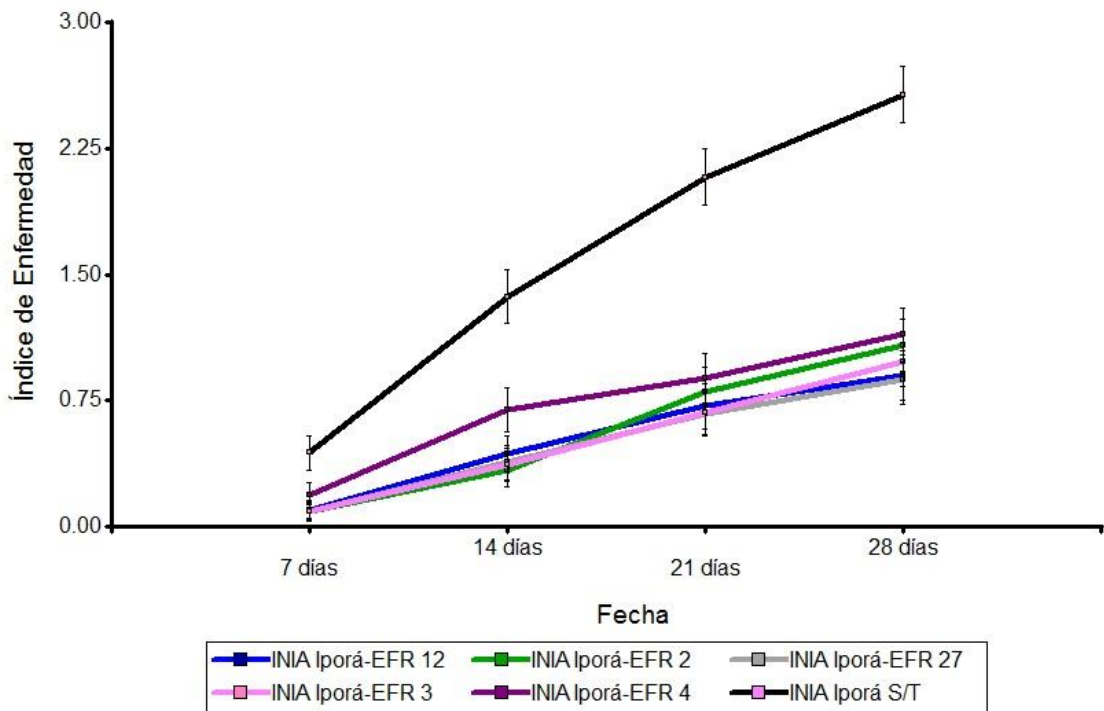


Imagen 9. Índice de la enfermedad por fecha en días post inoculación de las cinco líneas con mayor tendencia en la resistencia a *R. solanacearum* de INIA Iporá-EFR y el testigo sin transformar

3.5.6.2. Líneas del Clon 09509.6

Se observa en el Cuadro 8 que las líneas con mayor resistencia a la enfermedad son la 38, 37, 41, 34 y 39. Los valores medios de AUDPC más bajos fueron observados para los tratamientos 31, 35, 40, 32 y 36, y no se diferencian del Clon 09509.6 sin transformar. Este comportamiento era esperado en tanto los análisis moleculares mostraron que las líneas 31, 35 y 36 no presentan el inserto EFR y las líneas 40 y 32 no expresan la proteína EFR.

Cuadro 8. AUDPC Media de las líneas del Clon 09509.6-EFR y el Clon 09509.6 sin transformar

Línea	AUDPC Media	
Clon 09509,6 EFR 38	1.97	A
Clon 09509,6 EFR 37	2.82	A
Clon 09509,6 EFR 41	3.91	A B
Clon 09509,6 EFR 34	7.85	A B C
Clon 09509,6 EFR 39	8.01	A B C
Clon 09509,6 EFR 31	12.74	A B C D
Clon 09509,6 EFR 35	14.96	B C D
Clon 09509,6 EFR 40	15.80	B C D
Clon 09509,6 EFR 32	16.60	C D
Clon 09509,6 EFR 36	20.95	D
Clon 09509,6 S/T	22.04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes Tukey ($p > 0.05$)

En la imagen 10 se aprecia la evolución del Índice de la Enfermedad de las cinco líneas del Clon 09509.6-EFR más resistentes a *R. solanacearum* que se diferencian significativamente del testigo sin transformar. Se observa una dispersión mayor entre las líneas del Clon 09509.6-EFR (Imagen 10) con respecto a las líneas de INIA Iporá-EFR (Imagen 9).

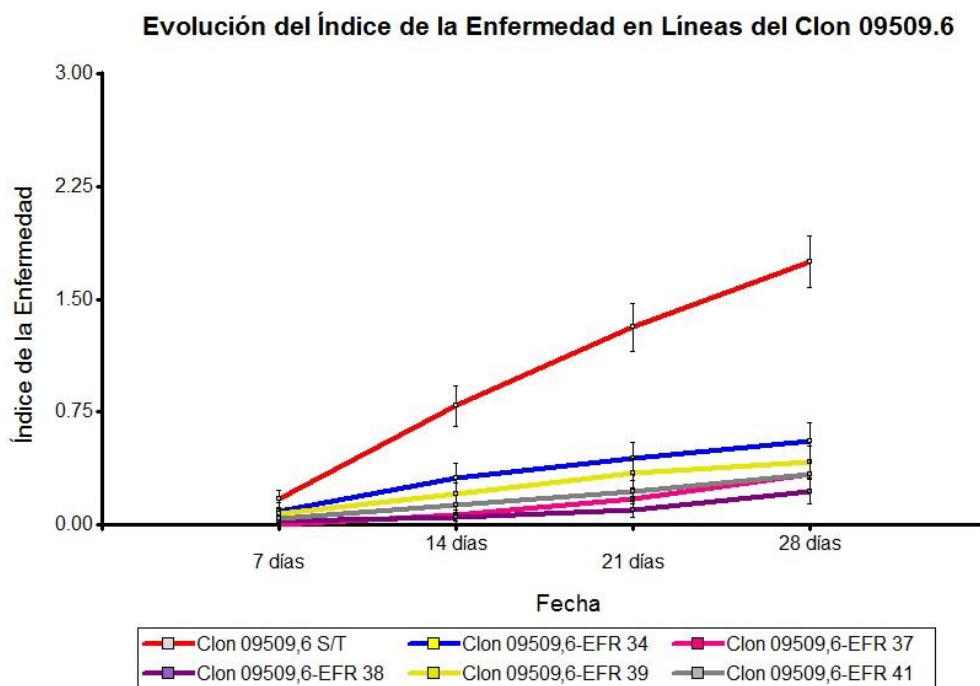


Imagen 10. Índice de la enfermedad por fecha en días post inoculación de las cinco líneas más resistentes del Clon 09509.6-EFR y el testigo sin transformar

3.5.7. Detección de *R. solanacearum* en infección latente en tallo

La detección por PCR y recuento de colonias se realizó con las cuatro líneas más promisorias de cada base genética que presentaban plantas asintomáticas al final del ensayo (28 dpi). En el Cuadro 9 se detallan las líneas seleccionadas y los resultados obtenidos para las líneas de INIA Iporá-EFR y del Clon 09509.6-EFR respectivamente.

Cuadro 9. Líneas de INIA Iporá-EFR y Clon 09509.6-EFR utilizadas para la detección en tallo de *R. solanacearum* por PCR y recuento bacteriano en placa

Línea	Réplica	PCR	Recuento en placa	Línea	Réplica	PCR	Recuento en placa
INIA Iporá- EFR 2	1	+	> 2,5x10 ³ ufc/ml	Clon 09509.6-EFR 34	1	+	1,1x10 ² ufc/ml
	2	-	< 10 ufc/ml		2	-	< 10 ufc/ml
	3	-	< 10 ufc/ml		3	-	< 10 ufc/ml
	4	+	> 2,5x10 ³ ufc/ml		4	-	< 10 ufc/ml
INIA Iporá-EFR 3	1	-	< 10 ufc/ml	Clon 09509.6-EFR 37	1	-	< 10 ufc/ml
	2	-	< 10 ufc/ml		2	+	1,5x10 ² ufc/ml
	3	-	< 10 ufc/ml		3	-	< 10 ufc/ml
	4	-	< 10 ufc/ml		4	-	< 10 ufc/ml
INIA Iporá-EFR 12	1	-	< 10 ufc/ml	Clon 09509.6-EFR 38	1	+	1,0x10 ² ufc/ml
	2	+	2,4x10 ² ufc/ml		2	+	3,8x10 ² ufc/ml
	3	+	> 2,5x10 ³ ufc/ml		3	-	< 10 ufc/ml
	4	-	< 10 ufc/ml		4	-	< 10 ufc/ml
INIA Iporá-EFR 27	1	-	< 10 ufc/ml	Clon 09509.6-EFR 41	1	+	9,6x10 ² ufc/ml
	2	-	< 10 ufc/ml		2	-	< 10 ufc/ml
	3	-	< 10 ufc/ml		3	-	< 10 ufc/ml
	4	-	< 10 ufc/ml		4	-	< 10 ufc/ml

La detección latente de la bacteria *R. solanacearum* por PCR y el recuento de colonias en las líneas INIA Iporá-EFR 27 y 3 fueron negativas, por lo tanto, estas líneas presentarían una alta resistencia a la enfermedad y no detectándose la presencia latente de la bacteria en el tallo. Sin embargo, en al menos una réplica de todas las líneas del Clon 09509.6-EFR se detectó la bacteria en tallo (Cuadro 9).

Únicamente en el Clon 09509.6-EFR 38 (Cuadro 9) se detectó la bacteria en dos réplicas, a diferencia de las otras 3 líneas en que se observó en una muestra de las cuatro

evaluadas. Lo cual sugiere que estas líneas tendrían menor tendencia a producir infecciones latentes en tallo. Es de resaltar que la detección latente fue en muy baja concentración, por ende configura un escenario favorable para la resistencia, en tanto que la bacteria no llegaría a niveles de población celular de QS y su presencia no resultaría virulenta.

3.5.8. Detección de *R. solanacearum* en infección latente en tubérculo

En la detección de la presencia latente de *R. solanacearum* en tubérculo se observa que para el control sin transformar de INIA Iporá sobrevivió solamente el 9 % de las plantas y que en el 100 % de los tubérculos se detectó la presencia de la bacteria de forma latente. En cambio, las líneas INIA Iporá-EFR 3 y 27 sobrevivieron el 46 % y 64 % de las plantas respectivamente y no se detectó la presencia de la bacteria (Imagen 11) en los tubérculos. Por lo tanto, estos resultados fueron consistentes con lo obtenido en el ensayo anterior, ya que las líneas INIA Iporá-EFR 3 y 27 tampoco habían presentado la bacteria latente en tallo (Cuadro 9).

En todas las líneas del Clon 09509.6-EFR se detectó la presencia latente de la bacteria en tubérculo y en tallo (Cuadro 9; Imagen 11), por lo tanto, en estas líneas se mantiene la bacteria en el vegetal pero no llegaría al número para que se alcance el estadio de QS y generar virulencia en las plantas. La presencia en tubérculo en estas líneas en ningún caso supera el 30 % de los tubérculos. Los valores de concentración en tubérculo no fueron considerados dado que la presencia o no de la bacteria es el argumento fundamental del estudio, dado que es un cultivo de propagación vegetativa y la sola presencia de la bacteria en tallo es suficiente para diseminar el inóculo con la papa semilla.

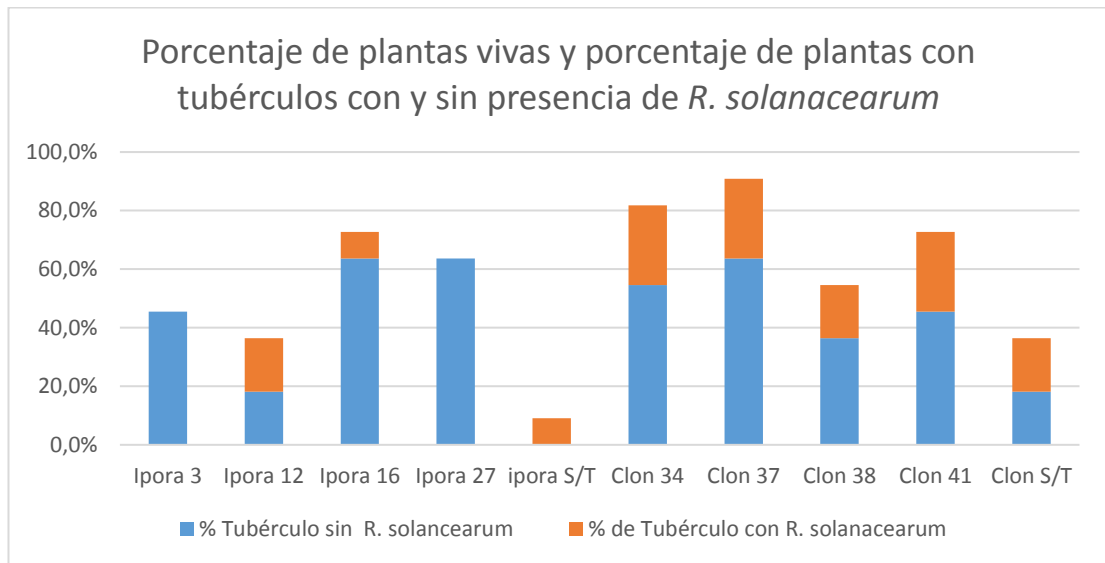


Imagen 11. Porcentaje de plantas vivas y porcentaje de plantas con tubérculos con y sin presencia de *R. solanacearum*.

3.6. DISCUSIÓN

En el Cuadro 10 se resume la información de los resultados obtenidos para las siguientes variables estudiadas: a) presencia o ausencia del inserto, b) número de copias del inserto, c) expresión proteica, d) funcionalidad proteica, e) índice de enfermedad (área bajo la curva, AUDPC), f) presencia de la *R. solanacearum* en tallo y g) porcentaje de tubérculos sin *R. solanacearum*; para el total de líneas y los testigos evaluadas en este trabajo.

Cuadro 10. Caracterización estructural y funcional de los eventos de transformación en INIA Iporá, el Clon 09509.6 y los testigos evaluados. Evaluación del avance de la enfermedad y detección de *R. solanacearum* en tallo y tubérculo.

Línea	Secuencia Codificante	Nº de Copias	Expresión Proteica	Función Proteica	Área bajo la curva (Tukey)		Presencia en tallo	% de tubérculo C/RS
Clon 09509,6EFR 38	si	12	+	+	1.97	A	+	33 %
Clon 09509,6EFR 37	si	3	+	+	2.82	AB	+	30 %
Clon 09509,6EFR 41	si	3	+	+	3.91	ABC	+	37 %
Clon 09509,6EFR 34	si	1	+	+	7.85	ABCD	+	33 %
Clon 09509,6EFR 39	si	10	+	+	8.01	ABCD	N/E	N/E
INIA Iporá EFR 27	si	2	+	+	11.10	ABCDE	-	0 %
INIA Iporá EFR 3	si	1	+	+	11.38	ABCDE	-	0 %
INIA Iporá EFR 12	si	1	+	+	11.89	ABCDE	+	50 %
INIA Iporá EFR 2	si	1	+	+	12.36	ABCDE	+	N/E
Clon 09509,6EFR 31	No	0	-	-	12.74	ABCDE	N/E	N/E
INIA Iporá EFR 16	si	4	+	+	13.21	ABCDE	N/E	12 %
INIA Iporá EFR 54	si	1	+	+	13.29	ABCDE	N/E	N/E
0,-4023	N/A	N/A	N/A	N/A	14.49	ABCDE	N/E	N/E
Clon 09509,6EFR 35	No	0	-	-	14.96	ABCDE	N/E	N/E
INIA Iporá EFR 11	si	1	+	+	15.31	ABCDE	N/E	N/E
Clon 09509,6EFR 40	si	1	-	-	15.80	ABCDE	N/E	N/E
INIA Iporá EFR 4	si	1	+	+	16.35	BCDE	N/E	N/E
Clon 09509,6EFR 32	si	1	-	-	16.60	BCDE	N/E	N/E
INIA Iporá EFR 53	si	4	+	+	18.13	CDE	N/E	N/E
13001-50	N/A	N/A	N/A	N/A	19.11	DE	N/E	N/E
Clon 09509,6EFR 36	No	0	-	-	20.95	DE	N/E	N/E
INIA Iporá EFR 8	si	1	+	+	21.44	DE	N/E	N/E
Clon 09509,6 S/T	N/A	N/A	N/A	N/A	22.04	DEF	N/E	50 %
13001-41	N/A	N/A	N/A	N/A	24.12	EF	N/E	N/E
INIA Iporá S/T	N/A	N/A	N/A	N/A	36.18	F	N/E	100 %

Inserto: presente (Si) o ausente (No)

Expresión proteica: expresa (+) o no expresa (-)

Funcionalidad proteica: funcional (+) o no funcional (-)

Presencia latente en tallo: presente (+) o ausente (-)

No aplica: N/A

No efectuado: N/E

Testigo: (T)

C/RS: Con *R. solanacearum*

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Como se observa en el Cuadro 10, se logró obtener germoplasma con alto grado de resistencia para las condiciones exigentes de inoculación practicada. Como fue presentado anteriormente, la base genética tiene efecto significativo sobre la respuesta a la inoculación con *R. solanacearum* y la misma parece verse incrementada con la presencia del gen EFR.

El método de transformación empleado no controla el sitio de inserción ni el número de copias en el genoma y esta característica se observó diferencialmente entre INIA Iporá y el Clon 09509.6. Según Gelvin (2003) el número de copias que se insertan puede afectarse principalmente debido a la base genética, el estado de desarrollo de las plantas a transformar, la especie vegetal, el desarrollo de las bacterias, el gen a introducir, entre otros. Como se observa en los cuadros 5 y 10 no en todas las plantas de INIA Iporá y del Clon 09509.6 se insertó el mismo número de copias y entre las líneas del clon que tiene genes introgresados de *S. commersonii* fue más variable el número de copias que se insertaron.

Por los resultados en el Cuadro 10 no se observa una relación entre el número de copias y el grado de resistencia a la inoculación, aunque todas las líneas del Clon 09509.6-EFR que expresaron la proteína funcional obtuvieron un grado de resistencia mayor al sin transformar. En el caso de las líneas de INIA Iporá-EFR la línea 53 con cuatro copias se ubicó en la zona media-baja de la Tabla y la línea 16 también con cuatro copias en la zona media de la Tabla, sin embargo hubo líneas con copia única que mostraron mayor grado de resistencia.

La respuesta diferencial a la inoculación entre las dos bases genéticas transformadas demostraría que la presencia del gen EFR permite una activación del sistema de defensa de las plantas que fue más variable en las líneas del Clon 09509.6-EFR.

En INIA Iporá si bien existe una respuesta positiva en términos de resistencia, ésta se ve acotada en la variabilidad entre los eventos de transformación. Esta menor capacidad de respuesta podría condicionar su comportamiento ante la inoculación de manera que las plantas que sobreviven lograrían impedir el avance endógeno de la bacteria a nuevos sitios de infección.

Esta base genética acotada de recursos genuinos para el control bacteriano hace que las plantas de INIA Iporá-EFR que sobreviven son las que lograrían recluir el avance de la enfermedad, lo que estaría explicando los dos eventos en que no se detecta la presencia bacteriana en tallo ni en tubérculos (INIA Iporá-EFR: 3 e INIA Iporá-EFR: 27). Por lo tanto, si la bacteria logra eludir los niveles de control en INIA Iporá-EFR estaría logrando su dispersión y

llegaría al desarrollo del número poblacional de QS pasando de un fenotipo avirulento a un fenotipo virulento provocando la muerte de la planta.

La transformación de plantas no siempre resulta en la expresión eficiente de la proteína, esta problemática puede ser atribuida a los efectos de inserción en el genoma en regiones transcripcionalmente competentes o transcripcionalmente silenciosos lo cual resultaría en la expresión o no de la proteína (Gelvin, 2003). Esto puede haber sido lo ocurrido en las líneas del Clon 09509.6-EFR: 32 y 40 donde el gen se encuentra presente pero no se expresa la proteína. Por lo tanto, la inserción habría estado en un sitio que no se transcribe al ARN o no se traduce en proteína.

La expresión de la proteína y la funcionalidad resultó altamente relacionado con las líneas que obtuvieron alto grado de resistencia a la inoculación. En cambio, en algunas líneas de INIA Iporá que presentaron EFR funcional la resistencia obtenida en la inoculación si bien se diferenció del testigo sin transformar estuvo en la zona media-baja de la Tabla.

Zipfel *et al* (2006) reportaron que la percepción de los PAMP en las plantas parecería depender de la especie, lo que indica la rápida evolución de las PRR incluso entre especies estrechamente relacionadas. En efecto, estos autores demostraron la función del gen EFR de *Arabidopsis* cuando se expresa en las hojas de *N. benthamiana* fuera de la familia de las *Brassicaceae*. Entonces al parecer, EFR sería el único componente que falta a las plantas de *S. tuberosum* para que se genere el reconocimiento del PAMP EF-Tu y el desencadenamiento de respuestas de defensa inducidas. Esto indica la vigencia de las distintas metodologías en las estrategias de mejoramiento genético para introducir sistemas adicionales a las plantas con el fin de aumentar la capacidad de detección y protección frente a patógenos microbianos.

Un regulador central de la PTI es la quinasa asociada BRI1 (BAK1) en la membrana celular, también conocida como SERK3 en plantas solanáceas (Du *et al.*, 2015). La presencia de BAK1 en plantas de papa ha sido reportada y por lo tanto, se asume que la inserción del gen EFR en los genotipos de INIA Iporá y el clon 09509.6 resultó funcional debido a la formación del complejo EFR-BAK1 y sus posteriores reacciones que desencadenan la respuesta inmune por la percepción de PAMP de *R. solanacearum*. En *A. thaliana* la presencia de BAK1 formando complejos con el gen EFR ha sido ampliamente reportada por Zipfel *et al* (2006); Lacombe *et al* (2010).

La inserción del receptor EFR en bases genéticas que presentan algún grado de resistencia cuantitativa y pueden desencadenar diferentes mecanismos de respuestas permitiendo alcanzar un alto grado de resistencia a la inoculación. Este comportamiento se observa en las líneas del Clon 09509.6-EFR que expresan la proteína EFR funcional. En cambio, en bases genéticas que son totalmente susceptibles a la enfermedad con la inserción del receptor EFR se pueden alcanzar buenos niveles de resistencia igualando o superando en alguna situación el nivel alcanzado por la resistencia cuantitativa sin el receptor.

En este trabajo, el gen EFR cuando se expresa funcionalmente en INIA Iporá y en el Clon 09509,6 ha demostrado mejorar la respuesta a la incidencia de la enfermedad en plantas inoculadas con la bacteria. Como anteriormente fue expresado, la presencia de receptores PRR u otras proteínas de membrana podrían estar presente en los ancestros previo a la especiación. De hecho, Carvallo *et al.*, (2011) reportaron que *S. commersonii* y *S. tuberosum* se relacionan estrechamente en el tiempo y la divergencia entre estas dos especies sería solamente de 3 millones de años y que la distancia evolutiva entre las dos especies de *Solanum* y *A. thaliana* sería entre 112-156 millones de años.

Los resultados observados de presencia bacteriana en tubérculo son de suma importancia para los sistemas de producción de semillas dado que es una especie que se propaga vegetativamente. La posibilidad de contar en los programas de mejoramiento genético y en la multiplicación de semillas con líneas o variedades que logren regular en cierta medida la presencia de la bacteria en tubérculo sería una herramienta muy eficiente de no dispersar el patógeno a nuevos campos productivos.

En las líneas de INIA Iporá-EFR: 3 y 27 no se detectó la infección latente de *R. solanacearum* tanto en tallo como en tubérculo en las plantas que lograron completar el ciclo. Las plantas asintomáticas de estas líneas que no se enfermaron la estrategia vegetal fue mantener los niveles de bacteria casi nulo o muy bajo que no se detectan mediante esta rigurosa técnica. En cambio en todas las líneas del Clon 09509.6-EFR que no presentaron síntomas, la bacteria convive con el vegetal en niveles mayores que se logran detectar con esta técnica tanto en tallo como en tubérculo.

El testigo de INIA Iporá sin transformar que sobrevivió a la inoculación -definida como estocástica debido a lo errático de la infección en plantas inoculadas- en todos los tubérculos se detectó la presencia de la bacteria. En cambio, para el Clon 09509.6 sin transformar, que es

parcialmente resistente, en el 50% de los tubérculos de las plantas asintomáticas no se detectó la presencia de la bacteria.

R. solanacearum ha sido definido como un patógeno hemibiotrófico (Narancio *et al.*, 2013) y según los resultados observados en las líneas EFR se podría pensar que las plantas que sobreviven a la infección, lograrían el control del avance bacteriano pasando a una interacción biótropa, dado que la bacteria no alcanzaría al nivel de QS necesario para establecer un fenotipo virulento.

3.7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron genotipos-EFR que presentan un alto grado de resistencia a *R. solanacearum* en condiciones controladas.

El receptor EFR proveniente de *A. thaliana* con el promotor CaMV35s incorporado en genotipos de papa es expresado de forma funcional para todas las líneas de INIA Iporá-EFR y para las líneas del Clon 09509.6 EFR: 34, 37, 38, 39 y 41.

Existe diferencia incremental en la resistencia a la bacteria entre las líneas del Clon 09509.6-EFR en comparación con las líneas de INIA Iporá-EFR.

Las líneas 37, 38, 39, 41 y 34 del clon 09509.6 con el inserto EFR fueron significativamente más resistentes que este clon sin transformar.

Las líneas 2, 3, 4, 12 y 27 del cultivar INIA Iporá con el inserto EFR fueron significativamente más resistentes que esta variedad sin transformar.

La línea INIA Iporá EFR 3 es de copia única y no se detectó la bacteria latente en tallo ni en tubérculo: el receptor EFR actuaría reduciendo el número de células del patógeno.

Es posible generar y evaluar OGM a nivel nacional de interés para programas de mejoramiento genético y que pueden brindar alternativas productivas en cultivos donde las técnicas convencionales resultaron ineficientes.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Burlington, MA: Elsevier Academic Press

Beckman CH. 1964. Host responses to vascular infection. Annu. Rev. Phytopathol. 2 231–252

Beckman CH, Mueller WC, Tessier BJ, Harrison NA. 1982. Recognition and callose deposition in response to vascular infection in Fusarium wilt-resistant or susceptible tomato plants. Physiol. Plant Pathol. 20 1–10

Boller T, Felix GA. 2009. Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 379–406.

Bradshaw JE, Bryan GJ, Ramsay G. 2006. Genetic resources (including wild and cultivated Solanum species) and progress in their utilization in potato breeding. Potato Research, 49: 49–65.

Champoiseau PG, Jones JB, Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties [Online]. Madison: American Phytopathological Society. Available at <http://www.apsnet.org/online/feature/ralstonia/> Accessed 10 July 2016.

Chaparro-Garcia A, Wilkinson RC, Gimenez-Ibanez S, Findlay K, Coffey MD, Zipfel C. 2011. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. PLoS ONE 6, e16608.

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124: 803–14.

CIP- Centro Internacional de la Papa. 2007. Potato Bacterial Wilt. En línea: 20 de marzo 2016. www.cipotato.org/potato/pests_diseases/

CIP- Centro Internacional de la Papa. 2011. Potato. En línea: 10 de marzo 2016. www.cipotato.org/potato

Clough SJ, Lee KE, Schell MA, Denny TP. 1997. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. J Bacteriol 179, 3639–3648.

Dalla Rizza M. 2015. Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas. III Jornada Nacional de Fitopatología. I Jornada Nacional de

Protección Vegetal. Sociedad Uruguaya de Fitopatología. Montevideo. Uruguay. <http://www.sufit.org.uy/iii-jornada-nacional-de-fitopatologia-y-i-jornada-nacional-de-proteccion-vegetal/> Accessed 19 August 2016

Dalla Rizza M, Vilaró F, Torres DG, Maeso D. 2006. Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the Uruguayan breeding program. *Am. J. Pot Res* 83: 297. doi:10.1007/BF02871590.

Escobar MA, Dandekar AM. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci*, 8, 380-386.

FAO. 2012. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma. Italia. Pp. 42.

FAO. 2008. La Papa. Presentación de nuestro invitado especial: *Solanum tuberosum*, el «tubérculo humilde» que se propagó desde su cuna andina a través de seis continentes, y conjuró el hambre, alimentó el desarrollo económico y modificó el curso de la historia mundial. On-line: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0500s/i0500s02a.pdf>. Accessed 10 March 2016.

Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*.18, 265–276.

Ferreira V, Pianzola MJ, Vilaró F, Valls M, Siri MI. 2015. Nuevas herramientas para la selección y caracterización de germoplasma de papa con resistencia a marchitez bacteriana. In: Jornada Nacional de Fitopatología, 3; Jornada Nacional de Protección Vegetal, 1., 3 Setiembre 2015, Montevideo, Uruguay. Libro de Resúmenes. Montevideo (Uruguay): SUFIT, 2015. p. 18 Financiamiento: ANII, INIA, CAP, CSIC Grupos I+D. En línea: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5057/1/SUFIT-Jornada-LibroResumenes-2015.pdf>

Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26, 251–259.

Fradin EF, Thomma BPHJ. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7 71–86

Galván G, Franco Fraguas L, Quirici L, Santos C, Silvera E, Siri MI, Villanueva P, Raudiviniche L, González M, Torres D, Castillo A, Dalla Rizza M, Vilaró F, Gepp V, Ferreira F, Pianzola MJ. 2006. *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el

mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II IICA. Uruguay. p. 87-102.

Gelvin SB. 2003. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews. American Society for Microbiology, p. 16–37.

Genin S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. New Phytologist 187: 920-928.

González M, Galván G, Siri MI, Borges A, Vilaró F. 2013. Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. Agrociencia. Montevideo. Uruguay - Volumen 17 1:45-54

González M. 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master Thesis, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Grimault V, Gélie B, Lemattre M, Prior P, Schmit J. 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 44:105–123

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

Helman Y, Chernin L. 2015. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. Molecular Plant Pathology. 16(3), 316–329.

Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor JM. 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 1411–1419

Rodríguez M, Hirczak A. 2016. Certificación de Semillas y Plantas. Jornada Anual de Papa. INASE. En línea: 19 de setiembre de 2016. <http://www.inase.org.uy/sitio/Publicaciones/Default.aspx?s=dt-jt>

INASE. 2015. Estándar de Producción y Comercialización de Semillas de Papa. Certificación de Semillas y Plantas. En línea: 25 de abril de 2016. www.inase.org.uy

INASE. 2016. Registro Nacional de Cultivares. Evaluación y Registro de Cultivares. En línea: 25 de abril de 2016. www.inase.org.uy

Johnston SA, den Nijs TPN, Peloquin SJ, Hanneman RE. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 57: 5–9.

Johnston SA, Hanneman RE. 1982. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*. 217: 446–448.

Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, Pp. 323-329.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse P, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz BJ, Jones JD, Zipfel C. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology*. doi:10.1038/nbt.1613.

Laferriere LT, Helgeson JP, Allen C. 1999. Fertile *S. tuberosum* and *S. comersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 98:1272-1278.

Mercado Modelo. 2016. Anuario estadístico 2015. Montevideo Uruguay. En línea: 19 de abril 2016. http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=14e65d83-1b0e-419d-b273-57f05d6acd4f&groupId=42766

Muthoni J, Shimelis H, Melis R, Kinyua ZM. 2013. Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al.) in the Tropical Highlands. *American Journal of Potato Research* 90: 301–402.

Narancio R, Zorrilla P, Robello C, González M, Vilaro F, Pritsch C, Dalla-Rizza M. 2013. Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:823-835

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24 255–265

Rahman MA, Abdullah H, Vanhaecke M. 1999. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *J. Phytopathol.* 147 129–140

Saddler GS. 2005. Management of bacterial wilt disease. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. ed. Minnesota, USA. APS Press. pp 121-132.

Saile E, Schell MA, Denny TP. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87, 1264–1271.

Schell MA. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* 38, 263–292.

Schmiediche P. 1988. Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. In: Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato in 1987. French, E.R. Lima. Perú. International Potato Center. Pp. 19-28.

Siri MI, Sanabria A, Pianzola MJ. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Disease* doi: 10.1094/PDIS-09-10-0626.

Talboys PW. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 181 319–332

Vallejo F, Estrada E. 2002. Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional de Colombia. En línea: 29 de abril de 2016. <http://documents.mx/documents/2002vallejo-franco-mejoramiento-genetico-de-plantas.html>

Vilaró F, Rodríguez G, Pereira G. 2000. Jornada sobre mejoramiento de papa. Programa Hortifrutícola. Serie Actividades de Difusión Nro. 221. Las Brujas. Uruguay. Pp. 10.

Walker T, Collion MH. 1998. Priority setting at CIP for the 1998-2000 Medium Term Plan. International Potato Center. Lima, Perú. 48p.

Wenneker M, Verdel MSW, Groeneveld RMW, Kempenaar C, van Beuningen AR, Janse JD. 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105: 307-315.

Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX, Jiang BL, Li XZ, Wei HY. 2008. AvrACXcc8004, a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J. Bacteriol.* 190 343–355

Yadeta KA, Thomma BPHJ. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 4:97 10.3389/fpls.2013.00097.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-60.

4. CONCLUSIONES GENERALES

La adopción de la tecnología OGM con el gen EFR no presenta evidencias de riesgos razonables en los parámetros de Bioseguridad. Los aspectos ambientales, la diversidad biológica y la conservación del germoplasma no serían exponencialmente perjudicados por la adopción de esta tecnología. Tampoco se encontrarían evidencias que perjudiquen a la salud humana.

Los beneficios para el agricultor podrían ser de importancia dada la disminución de aplicaciones de productos químicos, la posibilidad de realizar cultivos en zonas que anteriormente estaban limitadas y la oportunidad de realizar otros cultivos de solanáceas en esos sistemas productivos.

Los beneficios a nivel mundial serían muy auspiciosos por disminuir la incidencia de una enfermedad que afecta al 8% del área de papa, con consecuencias productivas, sociales y ambientales.

Como en todo análisis de riesgo la posibilidad de que el fenómeno negativo ocurra siempre existe, por lo tanto, en caso de que se identifique y caracterice un posible riesgo las medidas de contingencia para minimizar el daño deben ser una prioridad al momento de efectuarlas.

El receptor EFR proveniente de *A. thaliana* con el promotor CaMV35s incorporado en genotipos de papa se expresa la proteína y resultó funcionalmente activo para todas las líneas de INIA Iporá-EFR y para las líneas del Clon 09509.6 EFR: 34, 37, 38, 39 y 41.

Se obtuvieron genotipos-EFR que presentan un alto grado de resistencia a *R. solanacearum* en condiciones controladas y existe diferencia incremental en la resistencia a la bacteria entre las líneas del Clon 09509.6-EFR en comparación a las líneas de INIA Iporá-EFR.

Las líneas 37, 38, 39, 41 y 34 del clon 09509.6 con el inserto EFR fueron significativamente más resistentes que este clon sin transformar. Al igual que las líneas 2, 3, 4, 12 y 27 del cultivar INIA Iporá con el inserto EFR analizadas contra INIA Iporá sin transformar.

La línea INIA Iporá EFR 3 es de copia única y no se detectó la bacteria latente en tallo ni en tubérculo: el receptor EFR actuaría reduciendo el número de células del patógeno.

Es posible generar y evaluar OGM a nivel nacional para el desarrollo de nuevos cultivares con determinados objetivos.

5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abramovitch, R.B.; Anderson, J.C.; Martin, G.B.** 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 601-11.
- Agrios, G.N.** 2005. *Plant Pathology*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press
- Aldabe, L.** 2000. *Producción de hortalizas en Uruguay*. Montevideo: Épsilon. 269p.
- Andersson, M.S.; de Vicente, MC.** 2009. Potato (*Solanum tuberosum* L) in gene flow between crops and their wild relatives. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 367–402
- Asai, T.; Tena, G.; Plotnikova, J.; Willmann, M.R.; Chiu, W.L.; Gomez-Gomez, L.; Boller, T.; Ausubel, F.M.; Sheen, J.** 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977–983.
- Beckman, C.H.** 1964. Host responses to vascular infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2 231–252
- Beckman, C.H.; Mueller, W.C.; Tessier, B.J.; Harrison, N.A.** 1982. Recognition and callose deposition in response to vascular infection in Fusarium wilt-resistant or susceptible tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.* 20 1–10
- Bejarano, E.R.; Khashoggi, A.; Witty, M.; Lichtenstein, C.** 1996. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:759–
- Boller, T y Felix, G.A.** 2009. Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.
- Boschi, F.; Vilaró, F.; Galván, G.; Siri, M.; Menoni, M.; Murchio, S.; Ferenczi, A.; Dalla Rizza, M.** 2015. Evaluación de la respuesta de genotipos transgénicos de papa *Solanum tuberosum* L. con el receptor EFR inoculados con *Ralstonia solanacearum*. *Jornada Técnica. Unidad de Biotecnología Serie Actividades de Difusión N° 755. IX Jornada de Agrobiotecnología. Las Brujas. Uruguay. Pp. 9-13. Publishing PhysicsWeb.* <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/ad-755.aspx> Accessed 26 June 2016.
- Bradeen, J.M y Haynes, K.G.** 2011. Introduction to potato. *In: Genetics, genomics and breeding of potato*. Ed. Brandeen JM and Kole C. Science publishers, p 296.

- Bradshaw, J.E.; Bryan, G.J.; Ramsay, G.** 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Research*, 49: 49–65.
- Bradshaw, J.E.; Gebhardt, C.; Govers, F.; Mackerron, D.K.L.; Taylor, M.A.; Ross, H.A.** 2007. *Potato biology and biotechnology advances and perspectives*. Edited by Vreugdenhil D. Elsevier, 857 p.
- Bravo-Almonacid, F.; Rudoy, V.; Welin, B.; Segretin, M.E.; Bedogni, M.C.; Stolorowicz, F.; Criscuolo, M.; Foti, M.; Gomez, M.; López, M.; Serino, G.; Cabral, S.; Dos Santos, C.; Huarte, M.; Mentaberry, A.** 2012. Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. *Transgenic Res.* 21:967-982.
- Burke, J.M y Rieseberg, L.H.** 2003. Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science, Brevia* 300:1250.
- Bury, J y Dekeyser, R.** 2004. *Biosafety in the Laboratory*. Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology. 3rd, revised edition. Bélgica. Pp. 72.
- Bushey, D.F.; Bannon, G.A.; Delaney, B.F.; Graser, G.; Hefford, M.; Jiang, X.; Lee, T.C.; Madduri, K.M.; Pariza, M.; Privalle, L.S.; Ranjan, R.; Saab-Rincon, G.; Schafer, B.W.; Thelen, J.J.; Zhang, J.X.; Harper, M.S.** 2014. Characteristics and safety assessment of intractable proteins in genetically modified crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. ;69 (2): Pp. 154-70.
- Carputo, D.; Castaldi, L.; Caruso, I.; Aversano, R.; Monti, L.; Frusciante, L.** 2007. Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*– *S. commersonii* hybrids. *Breeding Science*. 57: 145-151.
- Cartagena Protocol.** 2000. *Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica: texto y anexos*. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 30p. On line: <https://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-es.pdf>. Accessed 10 March 2016.
- Carvalho, M.A.; Pino, M.T.; Jeknic, Z.; Zou, C.; Doherty, C.J.; Shiu, S.H.; Chen, T.H.H.; Thomashow, M.F.** 2011. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/err066.

- Champoiseau, P.G.; Jones, J.B.; Allen, C.** 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties [Online]. Madison: American Phytopathological Society. Available at <http://www.apsnet.org/online/feature/ralstonia/> Accessed 10 July 2016.
- Chang, J.H.; Urbach, J.M.; Law, T.F.; Arnold, L.W.; Hu, A.; Gombor, S.; Grant, S.R.; Ausubel, F.M.; Dangl, J.L.** 2005. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2549–2554.
- Chisholm, S.T.; Coaker, G.; Day, B.; Staskawicz, B.J.** 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124: 803–14.
- CIP- Centro Internacional de la Papa** (2007) Potato Bacterial Wilt. En línea: 20 de marzo 2016. www.cipotato.org/potato/pests_diseases/
- CIP- Centro Internacional de la Papa** (2011) Potato. En línea: 10 de marzo 2016. www.cipotato.org/potato
- Clough, S.J.; Lee, K.E.; Schell, M.A.; Denny, T.P.** 1997. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. J Bacteriol 179, 3639–3648.
- Codex Alimentarius.** 2003. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome. CAC/GL 45. <http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm> Accessed 20 April 2016
- CONABIA.** 2016. Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Buenos Aires. Argentina. Consultado el 15 de marzo de 2016. On-line: http://www.minagri.gob.ar/site/agregado_de_valor/biotecnologia/25_Convocatoria%20CONABIA/index.php Accessed 18 April 2016
- Conner, A.J.** 2006. Biosafety Evaluation of Transgenic Potatoes: Gene Flow from Transgenic Potatoes. International Symposium. Ecological and Environmental Biosafety of Transgenic Plants. Pp. 127-140.
- Coutinho, T.A.** 2005. Introduction and prospects on the survival of *R. solanacearum*. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. APS Press: St Paul, MN, pp 29–38.
- Dalla Rizza, M.** 2015. Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas. III Jornada Nacional de Fitopatología. I Jornada Nacional de Protección Vegetal.

Sociedad Uruguaya de Fitopatología. Montevideo. Uruguay. <http://www.sufit.org.uy/iii-jornada-nacional-de-fitopatologia-y-i-jornada-nacional-de-proteccion-vegetal/> Accessed 19 August 2016

- Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.; Torres, D.G.; Maeso, D.** 2006. Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the Uruguayan breeding program. *Am. J. Pot Res* 83: 297. doi:10.1007/BF02871590.
- Defeu Soufo, H.J.; Reimolda, C.; Linneb, U.; Knusta, T.; Geschera, J.; Graumann, P.L.** 2010. Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:3163–3168.
- Delaney, B.; Astwood, J.D.; Cunny, H.; Eichen Conn, R.; Herouet-Guicheney, C.; MacIntosh, S.; Meyer, L.S.; Privalle, L.; Gao, Y.; Mattsson, J.; Levine, M.; The ILSI International Food Biotechnology Committee Task Force on Protein Safety.** 2008. Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food Chem. Toxicol.* 46 Suppl 2, S71–S97.
- DIEA-MGAP.** 2003. Estadísticas agropecuarias. Boletín Informativo. Caracterización de la Producción de Papa. Encuesta 2002. Serie de Encuestas N°213. Montevideo. Uruguay. Pp. 20.
- Douches, D.S.; Coombs, J.J.; Lacey, L.A.; Felcher, K.J.; Pett, W.L.** 2011. Evaluations of Transgenic Potatoes for Resistance to Potato Tuberworm in the Laboratory and Field. *Potato Association of America Am. J. Pot Res* 88: Pp. 91–95.
- Drezner, D.W.** 2007. All politics is global: explaining international regulatory regimes. Princeton: Princeton University Press; Chapter One. Pp. 30.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2006. Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. ISBN: 92-9199-029-9. Pp. 121. http://www.gmo-compass.org/eng/safety/human_health/126.position_efs_a_antibiotic_resistance_markers.html Accessed 19 August 2016.
- Escobar, M.A.; Dandekar, A.M.;** 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci*, 8, 380-386.
- Evenhuis, A.; Zadoks, J.C.** 1991. Possible hazards to wild plants of growing transgenic plants. A contribution to risk analysis. *Euphytica*. 55: 81-84.

- FAO.** 2012. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma. Italia. Pp. 42.
- FAO.** 2008 La Papa. Presentación de nuestro invitado especial: *Solanum tuberosum*, el «tubérculo humilde» que se propagó desde su cuna andina a través de seis continentes, y conjuró el hambre, alimentó el desarrollo económico y modificó el curso de la historia mundial. On-line: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0500s/i0500s02a.pdf>. Accessed 10 March 2016.
- FAO.** 2007. Instrumentos de la FAO sobre la Bioseguridad. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. ISBN 978-92-5-305729-0. Roma. Italia. Pp. 166.
- FAO.** 2001. Los organismos modificados genéticamente, los consumidores, la inocuidad de los alimentos y el medio ambiente. Organización de Naciones Unidas. ISBN 92-5-304560-4. Roma. Italia. Pp. 34.
- Felix, G.; Duran, J.D.; Volko, S.; Boller, T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265–276.
- Ferenczi, M.A.** 2013. Establishment of the Uruguayan biosafety framework and a regulatory perspective of environmental risk assessment for transgenic crops engineered with complex traits. *Plant Breeding, Genetics and Biotechnology - Horticulture – Doctor of Philosophy. Thesis.* Michigan State University. USA. Pp. 317
- Ferreira, J.L.; de Almeida Cançado, G.M.; Borém, A.; Silva Gomes, W.; Alemu Setotaw, T.** 2012. Biosafety and Detection of Genetically Modified Organisms, Transgenic Plants - Advances and Limitations, PhD. Yelda Ozden Çiftçi (Ed.), ISBN: 978-953-51-0181-9, InTech, On line: <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-and-limitations/biosafety-and-detectionof-genetically-modified-organisms> Accessed 25 March 2016
- Ferreira, V.; Pianzola, M.J.; Vilaró, F.; Valls, M.; Siri, M.I.** 2015. Nuevas herramientas para la selección y caracterización de germoplasma de papa con resistencia a marchitez bacteriana. In: Jornada Nacional de Fitopatología, 3; Jornada Nacional de Protección Vegetal, 1., 3 Setiembre 2015, Montevideo, Uruguay. Libro de Resúmenes. Montevideo (Uruguay): SUFIT, 2015. p. 18 Financiamiento: ANII, INIA, CAP, CSIC Grupos I+D. En línea: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5057/1/SUFIT-Jornada-LibroResumenes-2015.pdf>

- Flavier, A.B.; Clough, S.J.; Schell, M.A.; Denny, T.P.** 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26, 251–259.
- Fradin, E.F. y Thomma, B.P.H.J.** 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7 71–86
- Fuglie, K.O.** 2007. Priorities for potato research in developing countries: Results of a survey. *American Journal of Potato Research*, 84:353-365.
- Galván, G.; Franco Fraguas, L.; Quirici, L.; Santos, C.; Silvera, E.; Siri, M.I.; Villanueva, P.; Raudiviniche, L.; González, M.; Torres, D.; Castillo, A.; Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.; Gepp, V.; Ferreira, F.; Pianzola, M.J.** 2006. *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II IICA. Uruguay. p. 87-102.
- Gelvin, S.B.** 2003. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, p. 16–37.
- Genin, S.** 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187: 920-928.
- Gepp, V.** 2011. Manejo de enfermedades en la producción de papa. Curso Protección Vegetal Hortícola. Facultad de Agronomía. Accessed September 10, 2015 On-line: <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/PapaManejo2012.pdf>
- Ghislain, M.; Montenegro, J.D.; Juarez, H.; Del Rosario Herrera, M.** 2015. Ex-post analysis of landraces sympatric to a commercial variety in the center of origin of the potato failed to detect gene flow. *Transgenic Res.* 24:519–528.
- González, M.** 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master Thesis, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- González, M.; Galván, G.; Siri, M.I.; Borges, A.; Vilaró, F.** 2013. Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. *Agrociencia*. Montevideo. Uruguay - Volumen 17 1:45-54

- Gray, A.** 2012. Problem Formulation in Environmental Risk Assessment for Genetically Modified Crops: A Practitioner's Approach. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). Collection of Biosafety Reviews Vol. 6. Italia: 10-65
- Grimault, V.; G lie, B.; Lemattre, M.; Prior, P.; Schmit, J.** 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44:105–123
- Hammond, B.G.** 2008. Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Harlan, J.R. y de Wet, J.M.J.** 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon.* 20: 509-517.
- Harper, G.; Hull, H.; Lockhart, B.; Olszewski, N.** 2002. Review. Viral sequences integrated into plant genomes. *Annual Review of Phytopathology* 40:119–36.
- Hartung, F. y Schiemann, J.** 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal.* 78 742–752.
- Hauck, P.; Thilmony, R.; He, S.Y.** 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8577–8582.
- Hawkes, J.G. y Hjerting, J.P.** 1969. The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study. pp. xxiii + 525 pp.
- Hayward, A.C.** 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology.* 29: 65-87.
- Helman, Y. y Chernin, L.** 2015. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology.* 16(3), 316–329.
- Hilaire, E.; Young, S.A.; Willard, L.H.; McGee, J.D.; Sweat, T.; Chittoor, J.M.** 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 1411–1419
- Hull, R.; Covey, S.N.; Dale, P.** 2000. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecology in Health and Disease.* ISSN 0891-060X. 12: 1-5
- INASE.** 2016. Registro Nacional de Cultivares. Evaluación y Registro de Cultivares. En línea: 25 de abril de 2016. www.inase.org.uy

- INASE.** 2015a. Estándar de Producción y Comercialización de Semilla de Papa. Instituto Nacional de Semillas. On-line: www.inase.org.uy Accessed 25 April 2016
- INASE.** 2015b. Registro Nacional de Cultivares. Cultivos de Verano. Instituto Nacional de Semillas. On-line: www.inase.org.uy Accessed 25 April 2016
- Johnson, K.L.; Raybould, A.F.; Hudson, M.D.; Poppy, G.M.** 2007. How does scientific risk assessment fit within the wider risk analysis? *Trends in Plant Science* 12: 1-5.
- Johnston, S.A. y Hanneman, R.E.** 1982. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*. 217: 446–448.
- Johnston, S.A.; den Nijs, T.P.N.; Peloquin, S.J.; Hanneman, R.E.** 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 57: 5–9.
- Jones, J.D.; Dangl, J.L.** 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, Pp. 323-329.
- Jones, J.D.; Witek, K.; Verweij, W.; Jupe, F.; Cooke, D.; Dorling, S.; Tomlinson, L.; Smoker, M.; Perkins, S.; Foster, S.** 2014. Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 20130087. On-line: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0087> Accessed 15 March 2016
- Kim, H.S.; Desveaux, D.; Singer, A.U.; Patel, P.; Sondek, J.; Dangl, J.L.** 2005. The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6496–6501.
- Klumper, W.; Qaim, M.** 2014. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS ONE* 9 (11): e111629. doi:10.1371/journal.pone.0111629
- Kunze, G.; Zipfel, C.; Robatzek, S.; Niehaus, K.; Boller, T.; Felix, G.** 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.
- Kyndt, T.; Quispea, D.; Zhaic, H.; Jarrettd, R.; Ghislain, M.; Liuc, Q.; Gheysen, G.; Kreuzer, J.F.** 2015. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Plant Biology. PNAS*. vol. 112 no. 18: 1-6
- Lacombe, S.; Rougon-Cardoso, A.; Sherwood, E.; Peeters, N.; Dahlbeck, D.; van Esse, P.; Smoker, M.; Rallapalli, G.; Thomma, B.P.H.J.; Staskawicz, B.J.; Jones, J.D.; Zipfel, C.** 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology*. doi:10.1038/nbt.1613

- Laferriere, L.T.; Helgeson, J.P.; Allen, C.** 1999. Fertile *S. tuberosum* and *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 98:1272-1278.
- Love, S.L.** 1994. Ecological risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada. *News and Reviews*. Vol. 71: Pp. 647-658
- MAGP.** 2015. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Argentina Líder Mundial en Biotecnología. On-line: http://www.casarosada.gob.ar/pdf/PPT_-_DOS_EVENTOS.pdf Accessed 10 April 2016
- Maldonado, L.; Suárez, V.; Thiele, G.** 2008. Estudio de la adopción de variedades de papa en zonas pobres del Perú Centro Internacional de la Papa. ISSN 0256-8756 *Ciencias Sociales*. Perú. Pp. 46.
- McPartlan, H.C.; Dale, P.J.** 1994. An assessment of gene transfer by pollen from field grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. *Transgenic Research* 3: 216–225.
- Mercado Modelo.** 2016. Anuario estadístico 2015. Montevideo Uruguay. En línea: 19 de abril 2016. http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=14e65d83-1b0e-419d-b273-57f05d6acd4f&groupId=42766
- MGAP-DIEA.** 2013. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca – Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Anuario Estadístico Agropecuario 2013. On-line: www.mgap.gub.uy Accessed 20 March 2016
- MGAP-GNBIO.** 2015. Gabinete Nacional de Bioseguridad. OGM autorizados en Uruguay. On-line: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,gnbio,gnbio-ogms-autorizados-en-uruguay,O,es,0>, Accessed 10 January 2016
- Mudgett, M.B.** 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Reviews of Plant Biology*. 56: 509-531.
- Muthoni, J.; Shimelis, H.; Melis, R.; Kinyua, Z.M.** 2013. Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al.) in the Tropical Highlands. *American Journal of Potato Research* 90: 301–402.
- Nakagami, H.; Pitzschke, A.; Hirt, H.** 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci.* 10, 339-346.

- Narancio, R.; Zorrilla, P.; Robello, C.; González, M.; Vilaro, F.; Pritsch, C.; Dalla-Rizza, M.** 2013. Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:823-835
- NCBI.** 2016. The National Center for Biotechnology Information. LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR. On-line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/106371753> Accessed 12 April 2016
- Nickson, T.E.** 2008. Planning Environmental Risk Assessment for Genetically Modified Crops: Problem Formulation for Stress-Tolerant Crops. *Plant Physiology*. Vol. 147, pp. 494–502.
- Nu Hse, T.S.; Peck, S.C.; Hirt, H.; Boller, T.** 2000. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. *J. Biol. Chem.* 275, 7521–7526.
- Odell, J.; Nagy, F.; Chua, N.** 1985. Identification of DNA Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter. *Nature*. Vol 313. Pp. 810-812.
- Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C.** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24 255–265
- Pellegrini, P.A.** 2013. What risks and for whom? Argentina’s regulatory policies and global commercial interests in GMOs. *Technology in Society*. Elsevier. ISSN 0160-791X 35. Pp. 129–138.
- Priou, S.; Aley, P.; Gutarra, L.** 2005. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia Solanacearum species complex*. Allen, C.; Prior, P; Hayward, A.C. eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 261-268.
- Qayyum Rao, A.; Bakhsh, A.; Kiani, S.; Shahzad, K.; Ali Shahid, A.; Husnain, T.; Riazuddin, S.** 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* 27. Pp. 753–763
- Rabinowitz, D.; Linder, C.R.; Ortega, R.; Begazo, D.; Murguía, H.; Douches, D.S.; Quiros, C.F.** 1990. High levels of interspecific hybridization between *Solanum sparsipilum* and *S. stenotomum* in experimental plots in the Andes. *Am Pot J* 67:73–81
- Rahman, M.A.; Abdullah, H.; Vanhaecke, M.** 1999. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *J. Phytopathol.* 147 129–140
- Raybould, A.** 2010. Reducing uncertainty in regulatory decision-making for transgenic crops. More ecological research or clearer environmental risk assessment? *GM Crops* 1(1):1-7.

- Rodríguez, M.;** **Hirczak, A.** 2016. Certificación de Semillas y Plantas. Jornada Anual de Papa. INASE. En línea: 19 de setiembre de 2016. <http://www.inase.org.uy/sitio/Publicaciones/Default.aspx?s=dt-jt>
- Saddler, G.S.** 2005. Management of bacterial wilt disease. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. ed. Minnesota, USA. APS Press. pp 121-132.
- Saile, E.;** **Schell, M.A.;** **Denny, T.P.** 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 87, 1264–1271.
- Schell, M.A.** 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu Rev Phytopathol 38, 263–292.
- Schmiediche, P.** 1988. Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. In: Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato in 1987. French, E.R. Lima. Perú. International Potato Center. Pp. 19-28.
- Schmidt, R.M.** 2009. Amflora Facts. BASF. Plant Science Agricultural Center. On-line:[http://fundacion-antama.org/wp-content/uploads/2010/03/2009.10.29.Amflora Starch Facts.pdf](http://fundacion-antama.org/wp-content/uploads/2010/03/2009.10.29.Amflora_Starch_Facts.pdf) Accessed 12 April 2016
- Siri, M.I.;** **Galván, G.A.;** **Quirici, L.;** **Villanueva, P.;** **Ferreira, F.;** **Franco Fraguas, L.;** **Pianzola, M.J.** 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. Euphytica, 165: 371 – 382
- 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 doi: 10.1094/PDIS-09-10-0626.
- Spooner, D.M.;** **Salas, A.** 2006. Structure Biosystematics and Genetic Resources. Chapter 1. Pp. 39.
- Spooner, D.M.;** **McLean, K.;** **Ramsay, G.;** **Waugh, R.;** **Bryan, G.J.** 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 14694–14699.
- Staskawicz, B.J.;** **Mudgett, M.B.;** **Dangl, J.L.;** **Galan, J.E.** 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. Science 292, 2285–2289.
- Suter, G.W.** 2000 Generic assessment endpoints are needed for ecological risk assessment. Risk Anal 20(2):173–178.

- Talboys, P.W.** 1972.. Resistance to vascular wilt fungi. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 181 319–332
- Traynor, P.L.; Adair, D.; Irwin, R.** 2001. A Practical Guide to Containment. Greenhouse Research with Transgenic Plants and Microbes. ISBN: 0-9703604-0-1. Minnesota. USA. Pp. 74.
- UN.** 1992. Organización de Naciones Unidas. Convenio de la Diversidad Biológica. Rio de Janeiro. Brasil. On-line: <http://www.un.org/es/events/biodiversityday/convention.shtml> Accessed 10 March 2016
- UNIPROT.** 2016. The Universal Protein Resource (UniProt). Names and Taxonomy. On-line: <http://www.uniprot.org/uniprot/F8V1G4> Accessed 12 April 2016
- University of Nebraska.** 2016. Allergen Online. Allergen Protein database On-line: <http://www.allergenonline.com/> Accessed 22 April 2016
- Uruguay, MGAP.** 1996a. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Creación del Comité de Análisis de Riesgo en Plantas Transgénicas. Dirección General de Servicios Agrícolas. Resolución de 01/13/96.
- Uruguay, MGAP.** 1996b. Autorización para ensayos de investigación con *Eucalyptus* tolerante al herbicida glifosato. Dirección General de Servicios Agrícolas. Resolución de 09/27/96.
- Uruguay, MGAP-MVOTMA-MSP-MEF.** 2014. Resolución N° 65. Montevideo. Uruguay.
- Uruguay, MGAP-MVOTMA-MSP-MEF.** 2008. Decreto No. 353/008 del 07/21/08. Sobre la Bioseguridad de las plantas genéticamente modificadas y sus partes.
- USDA.** 2014. Department of Agriculture. Animal and Plant Health InspectionService. [Docket No. APHIS–2014–0076]. Vol. 79, No. 217. Pp. 66689. On-line: https://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS_20141110c.pdf Accessed 18 April 2016
- Vallejo, F.; Estrada, E.** 2002. Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional de Colombia. En línea: 29 de abril de 2016. <http://documents.mx/documents/2002vallejo-franco-mejoramiento-genetico-de-plantas.html>
- Vilaró, F.; Rodríguez, G.; Pereira, G.** 2000. Jornada sobre mejoramiento de papa. Programa Hortifrutícola. Serie Actividades de Difusión Nro. 221. Las Brujas. Uruguay. Pp. 10.
- Walker, T.; Collion, M.H.** 1998. Priority setting at CIP for the 1998-2000 Medium Term Plan. International Potato Center. Lima, Perú. 48p.
- Wenneker, M.; Verdel, M.S.W.; Groeneveld, R.M.W.; Kempenaar, C.; van Beuningen, A.R.; Janse, J.D.** 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and

natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105: 307-315.

- Wolt, J.D.; Keese, P.; Raybould, A.; Fitzpatrick, J.W.; Burachik, M.; Gray, A.; Olin, S.S.; Schiemann, J.; Sears, M.; Wu, F.** 2010. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic Res* 19:425–436.
- Woodfield, D.R.; White, D.W.R.** 1996. Breeding strategies for developing transgenic white clover cultivars. *Special publication-agronomy society of New Zealand*, 125-130.
- Xu, R.Q.; Blanvillain, S.; Feng, J.X.; Jiang, B.L.; Li, X.Z.; Wei, H.Y.** 2008. AvrACXcc8004, a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J. Bacteriol.* 190 343–355
- Yadeta, K.A.; Thomma, B.P.H.J.** 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 4:97 10.3389/fpls.2013.00097.
- Zipfel, C.; Kunze, G.; Chinchilla, D.; Caniard, A.; Jones, J.D.; Boller, T.; Felix, G.** 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-60.