

## Transformación genética de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, agente causal de la estría roja en caña de azúcar<sup>1</sup>

Romina P. Bertani\*\*, Natalia Mielnichuk\*\*\*, M. Francisca Perera\*\*\*\*, Victoria González\*\*, Adrian A. Vojnov\*\*\*, María I. Cuenya\*\* y Atilio P. Castagnaro\*\*\*\*.

### RESUMEN

La estría roja, cuyo agente causal es *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, es una de las principales enfermedades que afecta a la caña de azúcar en Tucumán. Hasta el momento poco se conoce sobre la colonización de la bacteria en la caña de azúcar y su movimiento durante la infección, por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar herramientas para monitorear la bacteria durante el ciclo infectivo. Se evaluaron tres protocolos de transformación: químico, electroporación y conjugación, utilizando plásmidos con diferentes genes de proteínas fluorescentes y marcadores de selección. Las cepas de *A. avenae* subsp. *avenae* fueron evaluadas según la adquisición de resistencia a antibiótico y expresión de señal fluorescente. Además, se confirmó la identidad de los transformantes por PCR especie-específica. En este trabajo se obtuvieron bacterias con señal fluorescente estable únicamente por conjugación. Con el plásmido Aa::pHC60-gfp se obtuvo la mayor expresión de la proteína verde fluorescente *gfp*. Los ensayos *in vitro* mostraron que no hay diferencias entre el crecimiento de la cepa silvestre y transformada en medio líquido. Tanto las plantas infectadas con *A. avenae* subsp. *avenae* como con Aa::pHC60-gfp presentaron valores de incidencia y severidad similares 15 días después de la inoculación. Este es el primer estudio de expresión de un gen heterólogo en *A. avenae* subsp. *avenae* y representa una herramienta valiosa para el estudio de su biología y el proceso de colonización de caña de azúcar.

**Palabras clave:** *gfp*, conjugación, ciclo de vida.

### ABSTRACT

#### Genetic transformation of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, the causal agent of Red stripe in sugarcane

Red stripe (causal agent *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) is one of the main diseases that affect the sugarcane crop in Tucumán. At the moment, the information on sugarcane colonization and movement of *A. avenae* subsp. *avenae* during infections is limited, so the aim of this study was to develop tools to monitor the bacteria during the disease cycle. Three transformation methods were tested: chemical, electroporation and conjugation using plasmids containing different fluorescent proteins and selective gen markers. Mutant *A. avenae* subsp. *avenae* strains were evaluated for antibiotic resistance and expression of fluorescence signals. In addition, their identity was confirmed by PCR specie-specific. In this study, only transformation by conjugation presented stable fluorescent expression in the bacterium. The Aa::pHC60-gfp showed the highest expression of the green fluorescent protein *gfp*. *In vitro* assays showed not difference between the growth of wild type strain and the mutant one in liquid media. Plants inoculated either with *A. avenae* subsp. *avenae* or Aa::pHC60-gfp presented comparable incidence and severity 15 days after inoculation. This is the first report of an *A. avenae* subsp. *avenae* mutant strain expressing a heterologous gene and represents a valuable tool to study the biology of the bacterium and its colonization in sugarcane.

**Key words:** *gfp*, conjugation, disease cycle.

Fecha de recepción: 19/06/2019 - Fecha de aceptación: 01/10/2019

<sup>1</sup> Trabajo financiado por Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

\*\* Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC), Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC.

\*\*\* Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein (Fundación Cassará – CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, C1440FFX.

\*\*\*\* Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC.

## INTRODUCCIÓN

La estría roja, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Schaad *et al.*, 2008), es una enfermedad bacteriana que afecta al cultivo de caña de azúcar y puede reducir significativamente el azúcar teórico recuperable cuando los valores de incidencia superan el 25% (Johnson *et al.*, 2016).

En los últimos años se observó un incremento en la incidencia de estría roja en Tucumán, Argentina (Fontana *et al.* 2019), lo que reviste especial importancia si se considera que esta provincia contribuye con el 70% de la producción total de azúcar de la Argentina (Centro Azucarero Argentino, 2018; USDA, 2017). Sin embargo, hasta el momento se desconoce el proceso de colonización de la caña durante la infección por *A. avenae* subsp. *avenae*. Es por ello que se propone como objetivo de este trabajo obtener una cepa de *A. avenae* subsp. *avenae* fluorescente mediante transformación genética, como herramienta para ser utilizada en el análisis del ciclo de infección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se probaron tres métodos de transformación: química, electroporación y conjugación. En la Tabla 1 se resumen los plásmidos utilizados. Se incluyó la proteína fluorescente mCherry como un control de transformación, a pesar de no ser útil para seguir a la bacteria dentro de la planta debido a que presenta la misma fluorescencia que la clorofila.

La transformación química y la preparación de células electrocompetentes se realizaron de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989). Las electroporaciones fueron llevadas a cabo a 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  1800 V (cubas de 0,1 y 0,2 cm), 2500V (cuba de 0,2 cm) y a tiempo constante de 5 minutos. Para la conjugación, las cepas de *A. avenae* subsp. *avenae* y *Escherichia coli* S17-1 crecieron en medio líquido en una proporción 5:1 (*A. avenae* subsp. *avenae*: *E. coli*) (Bahar *et al.*, 2009) o crecieron en medio sólido y luego fueron colectadas y mezcladas.

Luego de la transformación, la bacteria se plaqueó en medio agar nutritivo con los antibióticos selec-

tivos. Las células que resultaron resistentes se evaluaron para confirmar su fluorescencia en microscopio de fluorescencia y su identidad mediante PCR con los cebadores Oaf1/Oar1 (Song *et al.*, 2001).

Para comparar las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y las transformadas, las células mutantes se incubaron en medio caldo nutritivo a 37°C, con agitación constante a 200 rpm por 36 h. Se midió la DO<sub>600</sub> a intervalos regulares de tiempo.

Se realizaron ensayos de inoculación en condiciones controladas en plantas de caña de azúcar mediante asperjado de la suspensión bacteriana de *A. avenae* subsp. *avenae* sin transformar y transformada con Aa::pHC60-gfp. Se observaron los síntomas 15 días después de la inoculación y se evaluó incidencia (n° plantas enfermas/n° total de plantas x 100) y severidad, empleando la escala de 1 [ $<0.5$  % área foliar afectada (AFA)] a 9 (más del 50% AFA) de acuerdo a la International Society of Sugarcane Technologists (ISSCT) (Hutchinson and Daniels, 1971).

## RESULTADOS

Solo se obtuvieron células fluorescentes cuando el método de transformación fue por conjugación y las bacterias se mezclaron directamente de sus placas en medio sólido ( $2 \times 10^5$  transconjugantes/mL). Las células mostraron fluorescencia cuando fueron transformadas con los plásmidos *pHC60-gfp* y *pFC1-gfp*; sin embargo, solo Aa::pHC60-gfp expresó GFP en forma estable y con buena intensidad (Figura 1a).

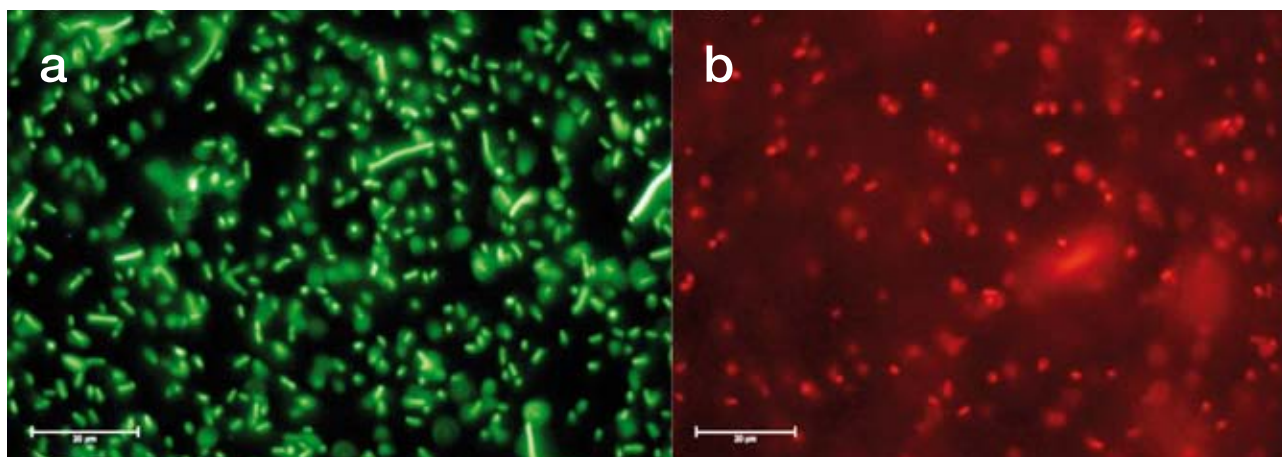
Los ensayos *in vitro* mostraron que no hay diferencias en el crecimiento en medio líquido de la cepa silvestre y el mutante Aa::pHC60-gfp (datos no mostrados). Además, los valores de incidencia y severidad a los 15 días, luego de inocular las plantas con la cepa marcada con GFP y la cepa salvaje, fueron semejantes (datos no mostrados).

En cuanto a la transformación con la proteína mCherry empleada como control, el mutante Aa::pHC60-mCherry obtenido presentó una señal de fluorescencia estable (Figura 1b), pero la cantidad de células transformadas obtenidas fue menor que las obtenidas para Aa::pHC60-gfp.

Tabla 1. Características de los plásmidos empleados en este estudio.

Plásmidos	Método de transformación	Características	Referencia
<i>pHC60-gfp</i>	Q, E, Co*	Derivado de pSW213, gen <i>gfp</i> , tetraciclina <sup>R</sup>	Chen and Walker (1998)
<i>pHC60-mCherry</i>	Q, E, Co	Derivado de pHC60-gfp, gen <i>mCherry</i> , tetraciclina <sup>R</sup>	Ramírez <i>et al.</i> (2010)
<i>pBBR2-gfp</i>	Q, E, Co	Derivado de pBBR1-MCS2, gen <i>gfp</i> , kanamicina <sup>R</sup>	Posadas <i>et al.</i> (2012)
<i>pFC1-gfp</i>	Q, E, Co	Derivado de pOT1, gen <i>gfp</i> , gentamicina <sup>R</sup>	Russo <i>et al.</i> (2006)
<i>pSEVA-gfp</i>	Q, E	Derivado de pSEVA427, gen <i>gfp</i> , cloramfenicol <sup>R</sup>	Silva-Rocha <i>et al.</i> (2012)
<i>pSEVA-mcherry</i>	Q, E	Derivado de pSEVA227R, gen <i>mCherry</i> , cloramfenicol <sup>R</sup>	Silva-Rocha <i>et al.</i> (2012)

\*: Q, química; E, electroporación; Co, conjugación; <sup>R</sup>: resistencia al antibiótico; *gfp*: green fluorescent protein; *mCherry*: red fluorescent protein.



**Figura 1.** Observación en microscopio óptico (100X) de la bacteria *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* marcada con las proteínas a) GFP y b) mCherry.

## CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo donde una cepa de *A. avenae* subsp. *avenae* expresa un gen heterólogo, lo cual constituye una valiosa herramienta para estudiar la biología de la bacteria y su colonización en caña de azúcar

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Bahar, O.; T. Goffer and S. Burdman. 2009. Type IV pili are required for virulence, twitching motility and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 909-920.
- Centro Azucarero Argentino. 2018. Argentina, Zafra azucarera 2016. [En línea]. Disponible en <http://www.centroazucarero.com.ar/oldsite/zafra/zafra2016.html>. (consultado 8 marzo de 2018; verificado 14 junio de 2019).
- Chen, H. P. and G. C. Walker. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium melioli*. *J. Bacteriol.* 180: 5183-5191.
- Fontana, P. D.; N. Tomasini; C. A. Fontana; V. Di Pauli; P. S. Cocconcelli; G. M. Vignolo and S. G. Salazar. 2019. MLST reveals a separate and novel clonal group for *Acidovorax avenae* strains causing red stripe in sugarcane from Argentina. *Phytopathology* doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0303-R.
- Hutchinson, P. B. and J. Daniels. 1971. A rating scale for sugarcane characteristics. En: *Proc. ISSCT Congress, 14, New Orleans, USA*, pp. 128-131.
- Johnson, R. M.; M. P. Grisham; K. Z. Warnke and J. R. Maggio. 2016. Relationship of soil properties and sugarcane yields to red stripe in Louisiana. *Phytopathology* 106: 737-744.
- Posadas, D. M.; V. Ruiz-Ranwez; H. R. Bonomi; F. A. Martín and A. Zorreguieta. 2012. BmaC, a novel auto-transporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cell. Microbiol.* 14: 965-982.
- Ramírez, G. A.; N. Voza; A. Zorreguieta and M. Tolmashky. 2010. Construction of the broad range cloning vector pHc60mCherry: plant microbe interaction applications. *FASEB J.* 24: Supplement 1.
- Russo, D. M.; A. Williams; A. Edwards; D. M. Posadas; C. Finnie; M. Dankert; J. A. Downie and A. Zorreguieta. 2006. Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 188:4474-4486.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schaad, N. W.; E. Postnikova; A. Sechler; L. E. Clafflin; A. K. Vidaver; J. B. Jones; I. Agarkova; A. Ignatov; E. Dickstein and B. A. Ramundo. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns, 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad *et al.*, 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 434-446.
- Silva-Rocha, R.; E. Martínez-García; B. Calles, M. Chavarría; A. Arce-Rodríguez; A. de Las Heras; A. D. Páez-Espino; G. Durante-Rodríguez; J. Kim; P. I. Nikel; R. Platero and V. de Lorenzo. 2012. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acid Res.* 41:D666-D675.
- Song, W. Y.; H. M. Kim and N. W. Schaad. 2001. PCR primers for detection and identification of plant pathogenic species, subspecies, and strains of *Acidovorax*. US Patent No. 09703807.
- USDA-United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. 2017. Sugar: World Markets and Trade. [En línea] Disponible en <http://www.apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/Sugar.pdf> (consultado 8 marzo de 2018; verificado 14 junio de 2019).