Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Aspectos moleculares de la interacción xanthomonas-planta

Rigano, Luciano Ariel

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Rigano, Luciano Ariel. (2011). Aspectos moleculares de la interacción xanthomonas-planta. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Rigano, Luciano Ariel. "Aspectos moleculares de la interacción xanthomonas-planta". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Aspectos moleculares de la interacción *Xanthomonas*-Planta

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Luciano Ariel Rigano

Director: Adrián A. Vojnov

Consejero de estudios: Dr. Luis A. Quesada Allué

Lugar de trabajo: Instituto Dr. César Milstein

Febrero de 2010

Agradecimientos:

A Adrian Vojnov, director de esta tesis, por haberme transmitido todas sus enseñanzas científicas durante este proceso, por estar abierto a todas mis ocurrencias, pero sobre todo por haberme guiado y aconsejado sobre los más amplios temas de la vida, como un hermano mayor lo hubiera hecho.

A mis compañeros de laboratorio, Pablo, Florencia, Eleonora y Valeria, (en orden de aparición) por haber compartido conmigo tantos buenos momentos en el laboratorio, divagando sobre los temas más insólitos y a veces reñidos con la moralidad. Los voy a extrañar equipo!!

En particular a:

Pablo: Por esas buenas noches de fernet y xbox.

Florencia: Por su excelente humor por las mañanas, no, ahora en serio, por ser una muy buena compañera de tesis.

Eleonora: Por su simpatía y su buena onda.

Valeria: Por su apoyo incondicional e indeclinable.

A la Dra. María Rosa Marano, y al Dr. Atilio Castagnaro y a sus respectivos grupos de trabajo, en especial a Florencia, Nadia, Ramón, Lorena, y Paula por toda la asistencia prestada para la realización de esta tesis.

A mis padres y familia, por haberme apoyado desde el muy principio (comprándome juegos de química, mecanos y transistores) en mi carrera científica.

A Débora, por haberme acompañado durante todo este proceso, y por compartir todo conmigo.

A mis amigos Pablo y Alfonso, por compartir conmigo sus ideas, las cenas gourmet (durante las cuales engordamos varios kilos), y por su apoyo científico, tecnológico y sobre todo beodo.

A mis amigos Gabriel, Matías y Matías, por los asados en casa, los torneos de truco, las salidas de pesca sin pescados, y por ser eso, amigotes!

Aspectos Moleculares de la interacción *Xanthomonas*-Planta.

El género *Xanthomonas* incluye a más de 300 especies que atacan a una gran variedad de plantas, entre ellas muchas de interés comercial. En esta tesis se trabajó en la caracterización de la interacción entre dos patovariedades de *Xanthomonas* y sus hospedadores.

En la primera parte de la tesis se describe la interacción entre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal de la putrefacción negra de las crucíferas y su hospedador *Arabidopsis thaliana*, y *Nicotiana benthamiana*, un nuevo modelo de interacción, focalizándonos en cual es el rol del glucano cíclico β-(1,2) en el proceso infectivo. Este compuesto demostró ser un supresor de la respuesta de defensa de la planta, a través de un mecanismo que involucra su capacidad de diseminarse sistémicamente dentro de la misma.

En la segunda parte de esta tesis se estudió la interacción entre *Xanthomonas citri* susp. *citri*, uno de los agentes causales de la Cancrosis Bacteriana de las Cítricos (CBC) y su hospedador *Citrus limon*. En particular se estudió el rol del exopolisacárido xantano producido por la bacteria en la formación de biofilms y en su virulencia. Encontramos que el xantano es fundamental para la formación de complejos multicelulares bacterianos, y que la formación de estos mismos tiene un rol central en la sobrevida de la bacteria en la planta y en la virulencia de la misma.

En la tercera, y última sección de esta tesis, se propuso la aplicación de los conocimientos adquiridos sobre la CBC en el desarrollo de un método de diagnóstico para esta enfermedad. El método desarrollado se basó en una amplificación de ADN isotérmica acoplada a tiras del tipo test de embarazo. Los resultados obtenidos muestran que el desarrollo es altamente específico, sensible, transportable y fácil de ser llevado a cabo.

Palabras Clave: *Xanthomonas*; supresión; glucano cíclico; xantano; biofilm; virulencia; detección.

Molecular Aspects of *Xanthomonas*-Plant Interaction.

The genus *Xanthomonas* contains more than 300 species that attack a wide variety of plants, including many commercial cultivars. In this thesis we worked on the characterization of the interaction between two pathovars of *Xanthomonas* and their hosts.

The first chapter of this thesis describes the interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causative agent of crucifer black rot and its host, *Arabidopsis thaliana*, and in the new model plant *Nicotiana benthamiana*, focusing on what is the role of cyclic β-(1,2) glucan, produced by the bacteria, in the interaction. This compound proved to be a suppressor of defense response of the plant, which has the ability to spread systemically within the host.

In the second part of this thesis, we have studied the interaction between *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, one of the causal agents of Citrus Bacterial Canker (CBC) and its host, *Citrus lemon*. In particular we studied the role of the exopolysaccharide xanthan produced by the bacteria, in biofilm formation and virulence. We found that xanthan is essential for the formation of bacterial biofilms, and that these structures play a central role in the survival of bacteria within the plant and their virulence.

In the third and final section of this thesis, we have used the knowledge acquired on CBC, in the development of a diagnostic method for this disease. The method developed was based on an isothermal DNA amplification technique coupled with lateral flow dipsticks. The results show that the test is highly specific, sensitive, portable and easy to be carried out.

Keywords: Xanthomonas; suppression; cyclic glucan; xanthan; biofilm; virulence; detection.

Indice

Capítulo 1	**Introducción**	1
1.1.1	Interacciones planta-microbio	2
1.1.2	Sistema de defensa vegetal	2
1.1.2.1	Visión general	2
1.1.2.2	Percepción del patógeno	4
1.1.2.3	La respuesta de la planta	7
1.1.3	Factores de virulencia en bacterias fitopatógenas	11
1.1.3.1	Manipulación de las vías de señalización de la planta	11
1.1.3.2	Producción de enzimas extracelulares	12
1.1.3.3	Sistema de secreción de tipo III	12
1.1.3.4	Producción de exopolisacáridos	15
1.1.3.5	Producción de glucanos cíclicos	15
1.1.4	El género *Xanthomonas*	17
1.2.1	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	18
1.2.2	El glucano cíclico de *Xanthomonas*	19
1.2.2.1	Aspectos genéticos de la biosíntesis de glucanos cíclicos	20
1.2.2.2	Mecanismo propuesto para la biosíntesis	20
1.3.1	*Xanthomonas citri* subsp. *citri*	21
1.3.2	Distintos tipos de CBC. Agentes causales	22
1.3.3	Importancia social y económica de los cítricos	23
1.3.4	Manejo de la enfermedad	24
1.3.5	Biofilms bacterianos	25
1.3.6	El exopolisacárido producido por *Xanthomonas*	27
1.4.1	Metodologías utilizadas para la detección de bacterias fitopatógenas	28
1.4.2	*Loop Mediated Isothermal Amplification*	29
1.5.1	Objetivos generales	32
1.5.2	Objetivos específicos	32
Capítulo 2	**Materiales y métodos**	33

2.1	Cepas bacterianas utilizadas	34
2.2	Plásmidos utilizados	35
2.3	Oligonucleótidos utilizados	36
2.4	Conservación de cepas bacterianas	36
2.5	Condiciones de crecimiento	37
2.6	Medios de cultivo	37
2.7	Antibióticos utilizados	38
2.8	Plantas y condiciones de crecimiento	39
2.9	Inoculación de plantas con suspensiones bacterianas y compuestos purificados	39
2.10	Extracción de ARN	43
2.11	*Northern Blot* y *Southern Blot*	43
2.12	Análisis de deposición de callosa	44
2.13	Aislamiento, manipulación y amplificación de ADN	45
2.14	Mutagénesis dirigida y complementación	49
2.15	Cromatografías	52
2.16	Cuantificación de hidratos de carbono	52
2.17	Extracción de glucanos periplasmáticos	53
2.18	Síntesis *in vitro* de glucanos cíclicos	53
2.19	Purificación de exopolisacáridos	53
2.20	Estudios de adherencia bacteriana	54
2.21	Microscopía confocal del biofilm	55
2.22	Diseño de cebadores para *Loop Mediated Isothermal Amplification*	56
2.23	Condiciones de reacción para *Loop Mediated Isothermal Amplification*	56
2.24	Análisis de los productos de reacción de *Loop Mediated Isothermal Amplification*	56

2.25	Estudios de sensibilidad del ensayo	57
2.26	Preparación de ADN para los ensayos de *Loop Mediated Isothermal Amplification*	58
2.27	Análisis estadístico	58
Capítulo 3	**Rol del glucano cíclico de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la interacción con su hospedador**	59
	Resumen	60
3.1	Generación y caracterización de una mutante defectiva en la biosíntesis de glucanos cíclicos	61
3.2	Caracterización de la interacción entre la cepa *ndvB* $^{-}$ y la planta	63
3.3	El glucano cíclico β-(1,2) compromete la resistencia a la enfermedad	68
3.4	El glucano cíclico β-(1,2) induce susceptibilidad sistémica a la enfermedad	74
Capítulo 4	**Formación de biofilms en *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: Rol en la virulencia y la supervivencia epifítica.**	82
	Resumen	83
4.1	Generación y caracterización de una mutante defectiva en la biosíntesis de xantano	84
4.2	Rol del xantano en la adhesión bacteriana a superficies bióticas y abióticas	87
4.3	*Xanthomonas citri subsp. citri* requiere de la producción de xantano para formar estructuras tipo biofilm *in vitro*	89
4.4	Biofilm y crecimiento epifítico durante la interacción *Xanthomonas citri* subsp. *citri-Citrus limón*	92
4.5	La mutante defectiva en la formación de biofilm es menos patógena	95
4.6	El desarrollo del cancro cítrico está asociado a la formación de biofilm	97

Capítulo 5	**Desarrollo de un método de diagnóstico para la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos**	101
	Resumen	102
5.1	Diseño de cebadores para LAMP que permitan la detección específica de las bacterias causantes de la Cancrosis de los Cítricos	103
5.2	Optimización de la reacción	106
5.3	Evaluación de muestras de campo	108
5.4	Pruebas de especificidad	110
5.5	Pruebas de sensibilidad	111
5.6	Evaluación de una colección de cepas	113
Capítulo 6	**Discusión**	116
Capítulo 7	**Bibliografía**	124

Capítulo 1

Introducción

1.1.1 Interacciones planta-microbio.

Los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para adaptarse al ambiente de las plantas, constituyendo interacciones que pueden ser beneficiosas o nocivas para las mismas. Las interacciones beneficiosas son causadas por bacterias simbióticas, como *Rhizobium* [1], bacterias no simbióticas como las cepas bacterianas que posibilitan la adsorción de nutrientes del suelo, como también por un tipo de hongo muy especializado, las micorrizas [2].

Las interacciones nocivas o patogénicas involucran viroides, virus, bacterias y hongos. Las pérdidas en cultivos a nivel mundial causadas por enfermedades microbianas alcanzan el 13%, y limitan severamente la producción de alimentos [2].

Las 11.000 enfermedades descriptas en plantas hasta el momento son causadas por 120 géneros de hongos, 30 tipos de virus y ocho géneros de bacterias [3]. El desarrollo de la enfermedad requiere de la coincidencia de un hospedador susceptible, un patógeno virulento en ese hospedador, y un medio ambiente favorable. La enfermedad es muy dependiente del medio ambiente, especialmente en patógenos que tienen una fase epifitica, que suele ser dependiente de la disponibilidad de agua que haya en la superficie de la hoja de la planta [3]. La temperatura y la humedad son parámetros que influencian marcadamente el desarrollo de los patógenos afectando su viabilidad y tasa de crecimiento.

Dada la importancia de las enfermedades en plantas, en relación a las grandes pérdidas económicas causadas, los estudios básicos sobre las interacciones planta-patógeno están recibiendo actualmente una gran atención. Esta Tesis intenta realizar un aporte en esa área, estudiando la interacción entre dos bacterias fitopatógenas y sus respectivos hospedadores.

1.1.2 Sistema de defensa vegetal.

1.1.2.1Visión General.

Como se comentó anteriormente, en la naturaleza las plantas están continuamente bajo el ataque de una amplia variedad de agentes patógenos. Cada uno de estos atacantes utiliza una estrategia de infección altamente especializada para establecer una relación parasítica con su hospedador. Dependiendo del estilo de vida,

los patógenos de plantas se pueden dividir en necrótrofos y biótrofos [4]. Los necrótrofos primero destruyen las células del hospedador, a menudo mediante la liberación de fitotoxinas, para luego alimentarse de los contenidos celulares. Los patógenos biótrofos desvían nutrientes de los tejidos vivos de la planta para su alimentación sin la destrucción total del tejido vegetal. Muchos patógenos de plantas pueden exhibir ambos tipos de vida, dependiendo de su etapa de desarrollo o ambiente, estos patógenos son llamados hemibiótrofos [4].

Para defenderse de esta gran variedad de patógenos, las plantas han desarrollado una importante cantidad de barreras físicas y metabolitos antimicrobianos preformados que constituyen una línea de defensa basal contra el ataque de patógenos.

Aunque en muchos casos estas barreras preformadas son efectivas, algunos patógenos son capaces de tener éxito en la tarea de atravesarlas. En este momento entra en juego una segunda línea de defensa, que se basa en una amplia respuesta que se induce ante la detección del patógeno atacante. Para este tipo de respuesta inducible, las plantas han desarrollado sofisticadas estrategias que les permiten detectar al patógeno y convertir esa detección en una respuesta inmune efectiva [5].

Primeramente, el sistema de defensa vegetal reconoce características comunes de los patógenos microbianos, como la flagelina, quitina, glucoproteinas y lipopolisacáridos [6, 7]. Estos determinantes microbianos son conocidos como patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*) [5]. Los PAMPs activan a los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, del inglés *Pattern-recognition receptors*) [5], los cuales inician una respuesta de defensa inespecífica, que termina desencadenando la llamada PTI (del inglés *PAMP-Triggered Immunity*) (Figura 1.1A) [8].

Debido a un proceso de continua co-evolución entre las plantas y sus atacantes, los patógenos han desarrollado moléculas efectoras (esquematizadas como estrellas en la Figura 1.1B) que normalmente son transportadas al interior de las células del hospedador mediante mecanismos de secreción especializados y que son capaces de suprimir la PTI y promover la virulencia del patógeno, resultando en la llamada susceptibilidad inducida por efector o ETS (del inglés *Effector-Triggered Susceptibility*) (Figura 1.1B) [8].

En un nuevo ejemplo de co-evolución, las plantas han adquirido proteínas de resistencia (R en la Figura 1.1C) que tienen la capacidad de reconocer a estos efectores bacterianos resultando en una fuerte respuesta de defensa conocida como inmunidad inducida por efector o ETI (del inglés *Effector-Triggered Immunity*) (Figura 1.1C) [8] que normalmente termina en una reacción de hipersensibilidad que mata el tejido vegetal infectado y restringe el avance del patógeno.

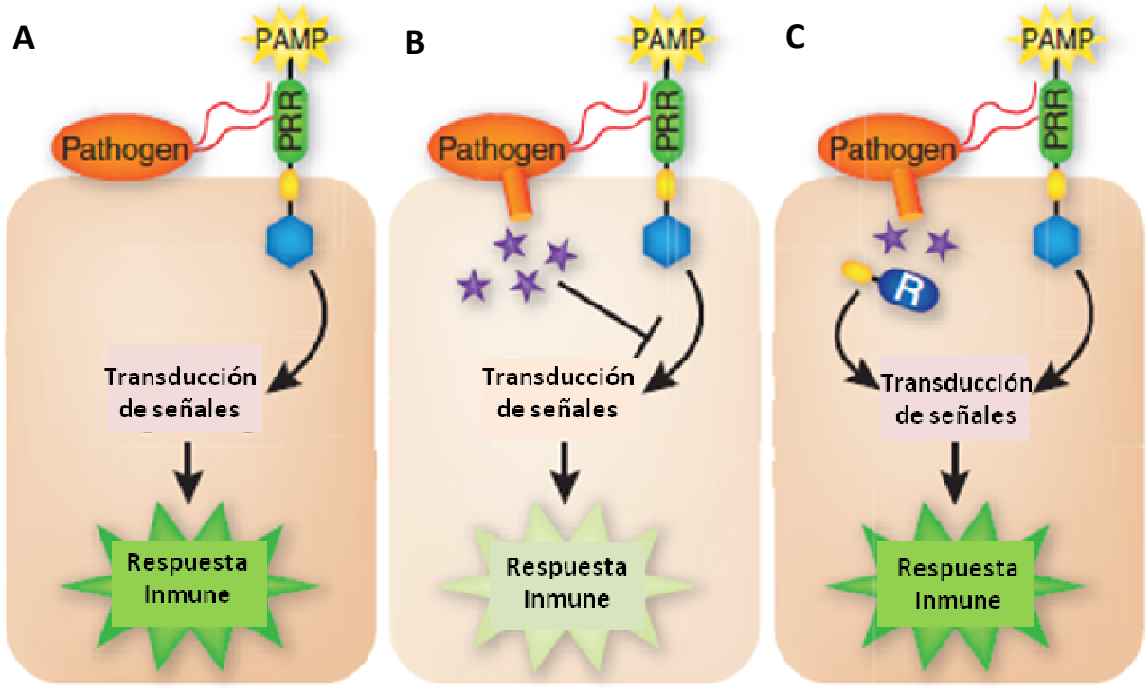


Figura 1.1: Representación simplificada del sistema inmune vegetal. (A) Inmunidad Inducida por PAMPs o PTI. (B) Susceptibilidad Inducida por Efector o ETS. (C) Inmunidad Inducida por Efector o ETI. Modificado de [9].

En últimas instancias, el resultado final de la batalla dependerá del balance entre la habilidad del patógeno para suprimir el sistema inmune de la planta y la capacidad de la planta para reconocer al patógeno y activar las defensas efectivas ante el atacante. A continuación se explican en más detalle los eventos relacionados a la inmunidad vegetal.

1.1.2.2 Percepción del patógeno.

El reconocimiento inespecífico: Elicitores o PAMP´s.

Los patógenos vegetales utilizan diversas estrategias de ataque que tienen como finalidad penetrar en la planta y colonizarla: las bacterias fitopatógenas entran a través de los estomas, de poros acuosos o de heridas y proliferan en los espacios intercelulares (apoplasto), los nematodos y áfidos se alimentan insertando su estilete directamente en una célula vegetal, los hongos pueden entrar directamente a través de las células epidérmicas, o extender sus hifas en la superficie de las células.

Como se comentó anteriormente los PAMPs del patógeno atacante pueden ser reconocidos por la planta, desencadenando una reacción de PTI.

Esta respuesta de PTI desencadena una serie de cambios en las células de la planta tales como variaciones en el potencial de membrana, producción de ROS, peroxidación de lípidos y fosforilación de proteínas, que alteran la fisiología celular y generan mensajeros químicos implicados en la activación de la resistencia local o sistémica [5, 9, 10].

El ejemplo más característico de un PAMP viene representado por el elicitor bacteriano flagelina, capaz de activar la respuesta defensiva en diversas plantas [11]. La movilidad de las bacterias mediante flagelos es importante para su patogenicidad [12] y esta capacidad para moverse depende de un apéndice llamado flagelo que se constituye de unidades de la proteína flagelina [12]. La flagelina actúa como un elicitor proteico, que contiene un dominio peptídico de 22 aminoácidos conservado capaz de inducir gran cantidad de respuestas celulares, incluyendo la rápida inducción transcripcional (en menos de 1 hora) de al menos 1100 genes en *Arabidopsis thaliana* [13, 14].

El reconocimiento específico: La interacción gen a gen.

Como se comentó anteriormente, los patógenos pueden superar la PTI. Dichos patógenos son capaces de sintetizar y secretar dentro de las células del hospedador moléculas efectoras, que tienen la función de suprimir la PTI, generando una ETS (Figura 1.1A, B). Estos efectores pueden en algunos casos actuar como factores de avirulencia (Avr), cuando son detectados por la planta según se explica en el siguiente párrafo [5].

Los efectores pueden ser reconocidos de forma específica por proteínas, que son producto de los genes de resistencia (R) de la planta. Estas proteínas tienen la

capacidad de unirse a nucleótidos y poseen dominios repetidos ricos en el aminoácido leucina. Al reconocer al efector bacteriano en el interior de la célula vegetal (Figura 1.1C), la proteína R desencadena una fuerte respuesta de defensa que conlleva a la muerte celular programada del tejido infectado y a la confinación del patógeno dentro de la zona inicial de infección (Figura 2.2). Este tipo de interacción se denomina interacción incompatible y es abarcado por el concepto de ETI ya comentado anteriormente.

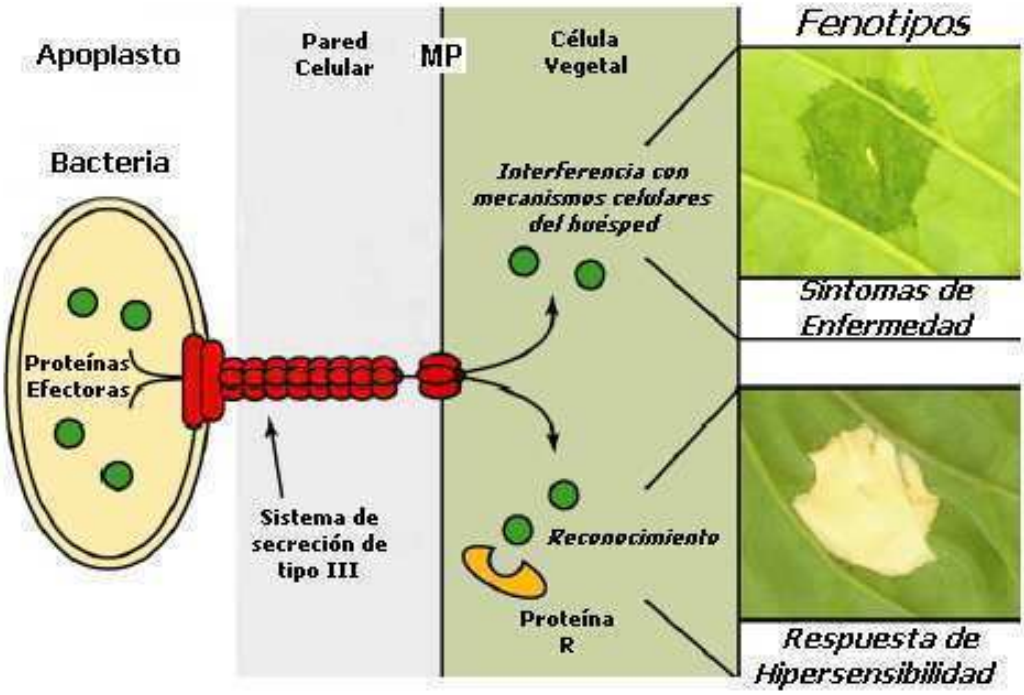


Figura 2.2: Modelo de Interacción compatible e incompatible. Modificado de [15].

En el caso de que ninguno de los efectores bacterianos encuentre en la planta el gen de resistencia correspondiente, la infección se extenderá a toda la planta, lo que se conoce como interacción compatible (Figura 2.2).

Este modelo se conoce como el modelo de “gen por gen” y fue propuesto por Harold Flor en 1971 siendo aceptado en la actualidad. Cabe destacar que los Avr suelen tener funciones importantes en la patogénesis, de manera que los patógenos no tengan tendencia evolutiva a perderlos.

1.1.2.3 La respuesta de la planta.

Respuestas defensivas locales.

Uno de los eventos más rápidos que acontecen en la célula vegetal tras la percepción del patógeno es un cambio en el potencial y la permeabilidad de la membrana plasmática. Los canales iónicos como la bomba H^+-ATPasa, se ven alterados. Se produce una modificación del flujo de iones que conlleva una acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma y una salida extracelular K^+ (Figura 1.3) [16, 17].

El calcio parece jugar un papel importante en el establecimiento de la respuesta de defensa, ya que es un segundo mensajero implicado en una gran variabilidad de procesos celulares y cambios fisiológicos [16]. Por una parte podría estar implicado en la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios [18], además de en la producción de especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*) [19]. Por otra parte, parece estar activando de forma diferencial factores de transcripción que regulan directamente la expresión de genes de defensa en la planta [20].

Muchos de estos eventos están mediados por cascadas de transducción de señales en las que suele estar implicada la fosforilación y desfosforilación de proteínas (Figura 1.3).

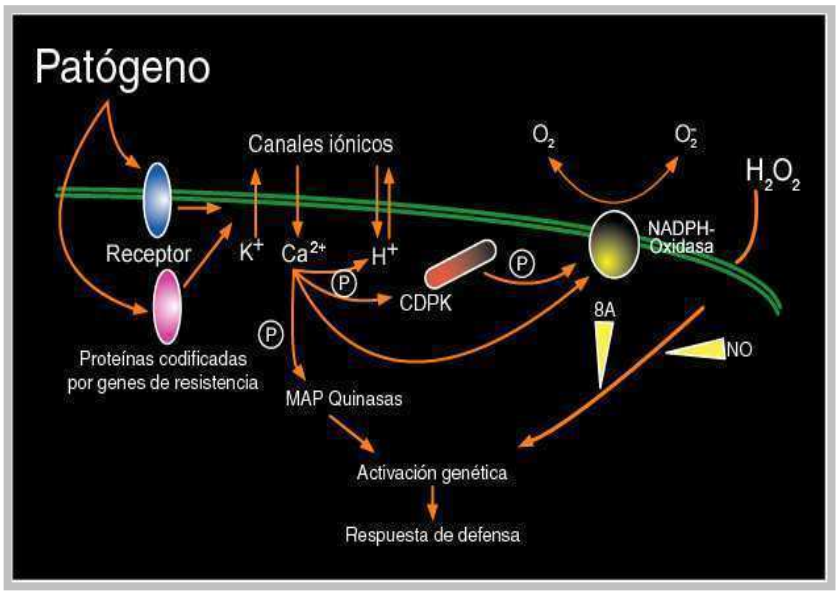


Figura 1.3: procesos que intervienen ante el ataque de patógeno. Gentileza de J. Parker.

Otro de los primeros eventos que acontecen en una célula vegetal tras la percepción del patógeno, es la acidificación del citoplasma y la consiguiente

alcalinización del medio extracelular (apoplasto). La acidificación del citoplasma es fundamental en la transducción de la señal de la respuesta defensiva, ya que constituye un paso previo a la generación de ROS y a la biosíntesis de metabolitos secundarios [21].

La explosión oxidativa, produce intermediarios tóxicos que provienen de la reducción del oxígeno molecular, tales como el anión superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 1.3) [22].

En las plantas se conocen diferentes fuentes de generación de ROS, como por ejemplo el complejo NADPH oxidasa, la peroxidasa apoplástica, y otras oxidasas de la mitocondria, cloroplasto y peroxisomas. En la mayoría de las especies vegetales es la activación del complejo NADPH oxidasa la fuente principal generación de ROS, aunque en algunas plantas también intervienen las peroxidasas del apoplasto [23].

Las ROS, aparte de resultar directamente tóxicas para el patógeno, están implicadas en numerosos procesos que acompañan a la respuesta defensiva. El H_2O_2 interviene en el reforzamiento de las paredes celulares, favoreciendo el entrecruzamiento de sus componentes o incrementando la síntesis y secreción de polímeros de lignina, por medio de un aumento en la actividad peroxidasa [24].

Además, el H_2O_2 es una señal intermediaria en la inducción de la propia explosión oxidativa que amplifica la señal. Con la explosión oxidativa se activan genes de defensa, y la acción conjunta y coordinada de las ROS, el óxido nítrico (NO) y el ácido salicílico (SA), activa el proceso de muerte celular programada en la respuesta hipersensible [24].

También como respuesta defensiva local, la planta induce la síntesis de fitoalexinas y metabolitos secundarios, como se ha comentado en párrafos anteriores, y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (del inglés *Pathogenesis Related Proteins*, PRs),

Este término incluye aquellas proteínas cuya expresión se ve inducida *de novo* bajo condiciones patogénicas [25]. La demostración de la actividad antimicrobiana que presentan algunas PRs, junto con el hecho de tratarse de genes cuya expresión se induce durante las respuestas de defensa, favorece la interpretación de que estas proteínas son en parte responsables del mantenimiento de la resistencia en la planta [25].

Existe una clasificación que las agrupa en diferentes familias dependiendo de las características particulares de cada una de ellas. Algunas proteínas PR han sido caracterizadas funcionalmente *in vitro* como antifúngicas y antimicrobianas. Otras presentan actividades quitinasas o glucanasas, sin embargo aún queda por determinar la función biológica y bioquímica de muchas de estas proteínas [25].

Otro grupo de PRs, activadas durante la respuesta defensiva, funcionan como proteasas, hidrolizando proteínas secretadas por el patógeno, o bien actuando en procesos de modificación de proteínas de la planta implicadas en la activación de las defensas. En la actualidad sirven como marcadores moleculares de la respuesta defensiva.

Respuestas defensivas sistémicas.

Durante la década del 60, Ross observó que plantas de tabaco que habían sido infectadas con Virus del Mosaico del Tabaco mostraban resistencia frente a una segunda infección en tejidos distales. A este tipo de resistencia se la identificó con el nombre de resistencia sistémica adquirida o SAR (del inglés *Systemic Adquired Resistance*), y se caracteriza por activarse después de la infección por parte de un patógeno o tras la aparición de HR (Figura 1.4).

En este tipo de respuesta la resistencia que adquiere la planta es duradera (a veces para el resto de la vida de la planta) y contra un amplio espectro de patógenos tales como virus, bacterias y hongos [26, 27].

El tiempo necesario para el establecimiento de SAR depende de la planta y del organismo inductor. El conjunto mayoritario de proteínas defensivas sintetizadas en las plantas durante dicha respuesta SAR pertenece a la familia de las proteínas PR.

La inducción de resistencia en partes de la planta distales al sitio de inoculación inicial sugiere la existencia de una señal que se desplazaría sistémicamente dando lugar al establecimiento de SAR [28]. En un inicio se propuso al ácido salicílico (SA, del inglés *Salicylic Acid*) como dicha señal, sin embargo ciertos experimentos han demostrado que no es la señal sistémica, aunque su presencia en tejidos distales es absolutamente necesaria para la implantación de SAR [29]. La naturaleza de la señal que se mueve sistémicamente e induce la SAR es objeto de una intensa investigación en el área de la señalización en inmunidad vegetal [9].

La planta mutante *dir1* (*defective in induced resistance1*) de *Arabidopsis thaliana* se caracteriza por su incapacidad para montar una respuesta SAR [30]. Dado que *dir1* codifica una proteína apoplástica de transferencia lipídica que se localiza en el floema, se plantea la posibilidad de que moléculas de naturaleza lipídica podrían ser las responsables de la señalización sistémica. Otras hipótesis sugieren que la señal móvil podría ser incluso un micro-RNA [31].

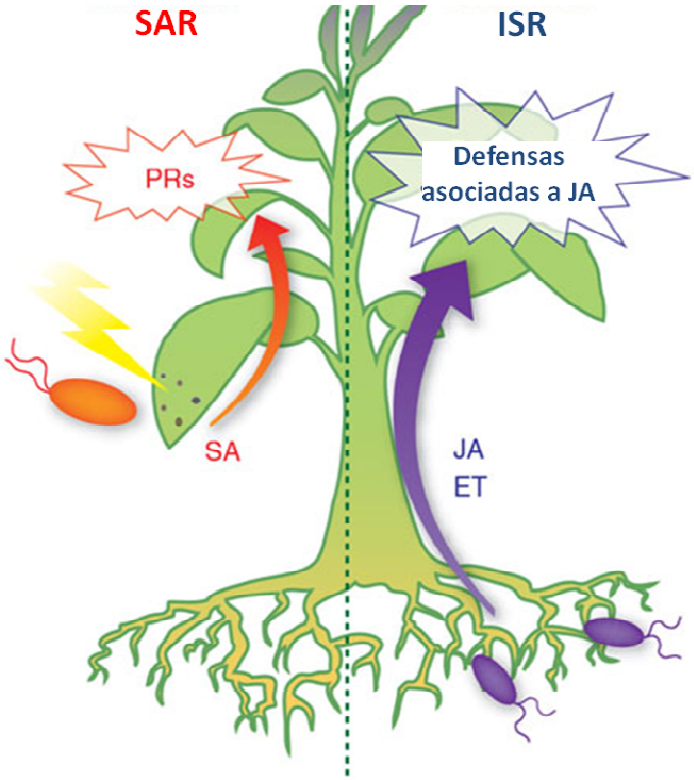


Figura 1.4: Representación esquemática de las respuestas de defensa sistémicas inducidas. Modificado de [9].

Los microorganismos beneficiosos para las plantas que se encuentran en el suelo, como los hongos que forman parte de las micorrizas, o las Rhizobacterias promotoras del crecimiento pueden inducir un tipo de inmunidad sistémica muy similar a la SAR (Figura 1.4), llamada Resistencia Sistémica Inducida o ISR (del inglés *Induced Systemic Resistance*) [32, 33].

De igual manera que los PAMP´s de los patógenos microbianos, algunos patrones moleculares de los microorganismos beneficiosos pueden ser reconocidos por las plantas, lo cual resulta en una suave, pero efectiva inducción de la respuesta de defensa en tejidos sistémicos [34].

A diferencia de la SAR, que es regulada al menos en parte por SA, la ISR parece estar regulada por ácido jasmónico (JA, del inglés *Jasmonic Acid*) y etileno (E) [35]. Mientras que la SAR es mayormente efectiva contra patógenos biótrofos, la ISR parece estar asociada a la resistencia contra los patógenos necrótrofos y los insectos herbívoros [36, 37].

1.1.3 Factores de Virulencia en Bacterias Fitopatógenas.

Al momento del contacto con la planta, las bacterias fitopatógenas ponen en marcha una variedad de estrategias que contribuyen al éxito de la invasión.

En la mayoría de los casos, la percepción de PAMPs/MAMPs por la célula vegetal es suficiente para eliminar al organismo microbiano [38]. Sin embargo, muchos patógenos desarrollaron estrategias altamente especializadas para evitar o suprimir la inmunidad del hospedador y causar la enfermedad.

Estos factores influyen en la virulencia, y son importantes para que las bacterias invadan y colonicen rápidamente el tejido, alcanzando altos niveles de población antes de que la respuesta de la planta limite el crecimiento bacteriano. A continuación se hace un pequeño resumen de algunos casos interesantes:

1.1.3.1 Manipulación de las vías de señalización de la planta.

En el caso específico de *Pseudomonas. syringae* se ha propuesto que utiliza el compuesto coronatina (un análogo al ácido jasmónico) para suprimir la defensa a través de su interferencia en la vía de señalización del ácido abscísico, el cual es necesario para mantener el cierre de los estomas [39]. Al impedir el cierre de los estomas la bacteria es capaz de ingresar a la planta por esa vía produciendo una infección exitosa.

La coronatina también tiene efecto inhibidor de la vía de señalización mediada por ácido salicílico, que es efectiva contra los patógenos biótrofos, como *Pseudomonas syringae* [40]. Al ser inhibida esta vía, la planta no puede defenderse contra la bacteria, y es colonizada por la misma, éste es un ejemplo de cómo los patógenos han aprendido a través de la evolución a manipular a sus hospedadores para poder ser exitosos en la infección.

En otro ejemplo de estrategia para contrarrestar las defensas del hospedador, nuestro grupo de trabajo demostró que *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sintetiza un compuesto difusible, presente en el sobrenadante del medio de cultivo bacteriano, capaz de interferir con el cierre estomático en plantas de *Arabidopsis*, facilitando el ingreso de la bacteria en el hospedador [41].

1.1.3.2 Producción de enzimas extracelulares.

La secreción de un amplio rango de enzimas capaces de degradar componentes de la pared celular de plantas vasculares y otros componentes celulares tiene un papel importante en enfermedades bacterianas como las podredumbres blandas y es de gran importancia en bacterias que causan necrosis o marchitamiento vascular. Estas enzimas están divididas en tres grandes grupos: enzimas pectolíticas, celulasas y proteasas. La producción de estas proteínas es de gran importancia en la virulencia, ya que mutantes que no las producen o tienen disminuida su producción se ven penalizadas en su virulencia [42].

1.1.3.3 Sistema de secreción de tipo III.

Muchas bacterias Gram-negativas patógenas de plantas y animales tienen un sistema de secreción de tipo III (T3SS, del inglés, *Type III Secretion System*) que está compuesto aproximadamente por 20 a 25 proteínas diferentes que conforman una maquinaria que protruye por fuera de la bacteria formando una estructura tipo aguja. La función de este sistema de secreción es introducir proteínas efectoras, o factores de patogenicidad, directamente desde la bacteria hacia el interior de la célula hospedadora [43].

La mayoría de las proteínas traslocadas por el sistema T3SS fueron originalmente descubiertas y caracterizadas por su función de avirulencia (Avr). El reconocimiento de las proteínas Avr induce una respuesta hipersensible en plantas que tienen el correspondiente gen de resistencia (*R*) como ya se ha mencionado previamente [5].

Los genes que codifican para T3SS en patógenos de plantas son llamados genes *hrp* (del inglés, *Hipersensitive Response and Pathogenicity*) [44].

El género *Xanthomonas* posee una variedad de genes que codifican para proteínas efectoras tipo III, las cuales son fundamentales para el desarrollo de

enfermedad. En *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, por ejemplo, el gen *pthA* es esencial para el desarrollo de cancros en los cítricos [45], al igual que los genes homólogos *pthB* y *pthC* encontrados en *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* tipo B y tipo C, respectivamente. Los genes *pthA*, *pthB* y *pthC* pertenecen a la familia génica de avirulencia/patogenicidad AvrBs3 y mutaciones en estos genes o en el sistema de secreción de tipo III generan cepas incapaces de desarrollar cancros [46, 47].

La proteína AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ha sido estudiada en mayor detalle que PthA, estudios recientes muestran que una vez inyectada dentro de las células del hospedador, AvrBs3 actúa como un activador transcripcional eucariota (Figura 1.5), activando la expresión de genes de la planta que favorecen la infección y la disponibilidad de nutrientes para la bacteria [48]; la inducción de estos genes produce una hiperplasia celular que se asocia con los síntomas en la planta. Los genes que son modulados por este tipo de efectores son denominados genes UPA (del inglés *Upregulated by AvrBs3*) y tienen una secuencia conservada en sus promotores llamada UPA-box [48].

Es interesante el descubrimiento de que algunas plantas, dentro de su estrategia de detección del patógeno, han colocado trampas moleculares en su genoma, mediante la ubicación de genes de resistencia (R) río debajo de una UPA-box, de esta manera al ser inducido el gen por el efector (Figura 1.5), se dispara una respuesta de defensa del tipo ETI [49].

Otro efector de tipo III de *Xanthomonas* estudiado en detalle es la proteína XopD, la cual muestra un dominio modular con diferentes actividades. En su región C-terminal contiene un dominio proteasa con especificidad por un modificador proteico llamado SUMO (del inglés *Small Ubiquitin Like Modificator*) [50]. Así como la ubiquitinación de proteínas marca a las mismas para su degradación, la *SUMOilación* de proteínas les da estabilidad, previniendo su degradación. Las plantas utilizan este mecanismo para modular la existencia de factores de transcripción asociados a senescencia y a distintos estreses, entre ellos el biótico [51]. En adición XopD tiene dos copias de un dominio represor transcripcional y un dominio de unión a ADN del tipo hélice-giro-hélice [52]. Se postula que mediante estos dominios de unión a ADN y represión transcripcional podría estar reprimiendo la expresión de genes aún no identificados [53]. Además se cree que mediante su dominio de proteasa XopD estaría

deSUMOilando factores de transcripción que estarían implicados en la expresión de genes de defensa [50] (Figura 1.5) desestabilizándolos y promoviendo su degradación con la consecuente inactivación de sus genes blanco.

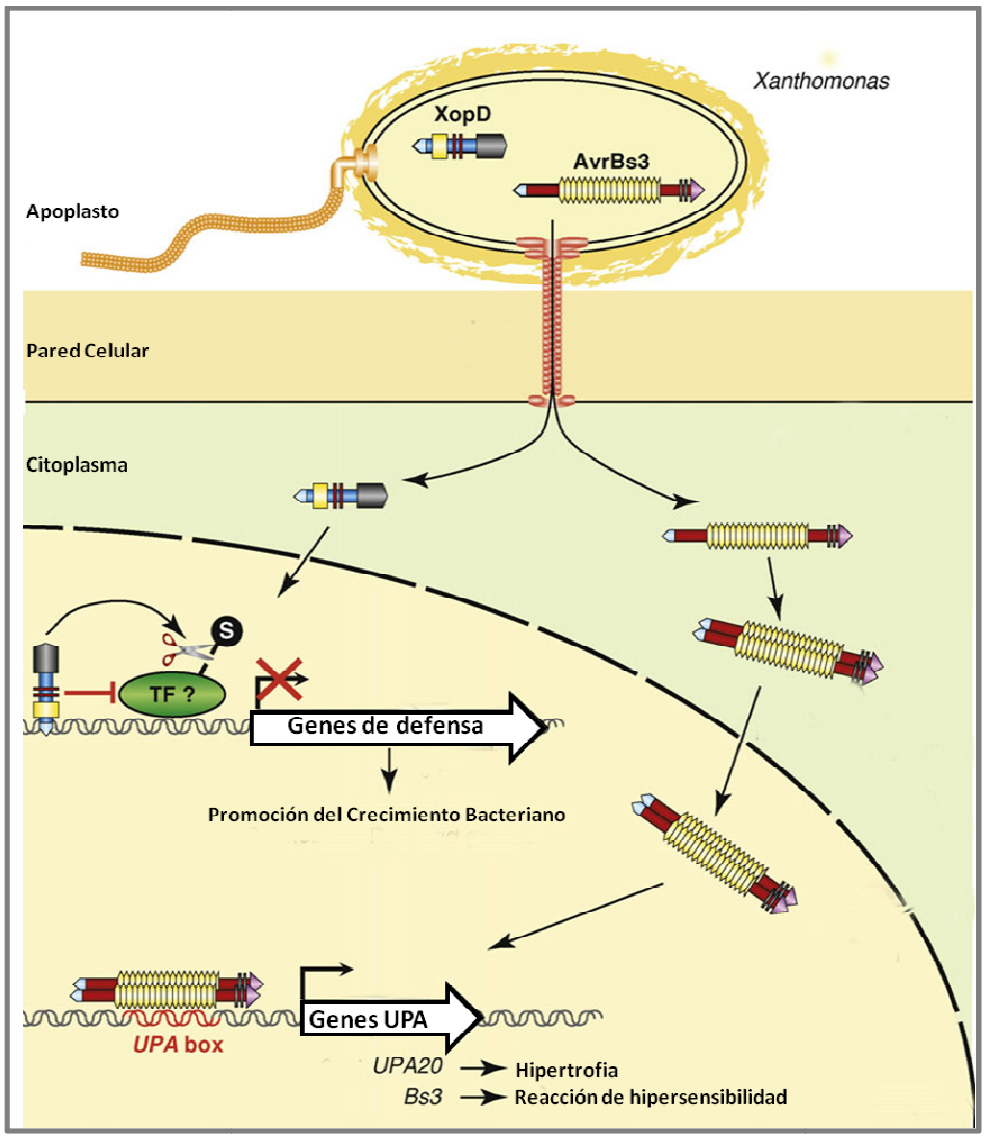


Figura 1.5: Modelo de acción de los efectores de tipo III XopD y AvrBs3. Modificado de [53].

En otro ejemplo, *Pseudomonas syringae* posee una serie de efectores de tipo III que tienen la capacidad de suprimir o modular distintos aspectos de la defensa de la planta. Por ejemplo los efectores AvrPto y AvrRpt2 suprimen las defensas de la planta asociadas el refuerzo de la pared celular mediante la deposición de callosa [54, 55]. El efector AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* es capaz de inhibir la muerte celular programada en una interacción incompatible o ETI, inhibiendo la capacidad del

hospedador de confinar la infección mediante la reacción de hipersensibilidad y provocando susceptibilidad [56].

1.1.3.4 Producción de Exopolisacáridos.

La producción de EPS (del inglés Extracellular Polysaccharide) y la posesión de cápsula se han mostrado importantes para la patogenicidad y virulencia de muchas bacterias patógenas de plantas [57-62].

Su composición está repartida entre levanos, alginatos, lipopolisacaridos y diversos heteropolisacáridos que son liberados y secretados al medio extracelular. Los EPS parecen estar implicados en el mantenimiento del "*water-soaking*" (zonas encharcadas) y previniendo el reconocimiento bacteria-planta al enmascarar algunos receptores bacterianos, causando cambios en la utilización de carbohidratos y promoviendo la restricción del movimiento del agua bloqueando los vasos del xilema [63].

Se postula que los EPS actúan también como agente de protección contra condiciones ambientales hostiles, teniendo un rol protagónico en la formación de comunidades microbianas o *Biofilms* [64], tema que será tratado en más detalle en siguientes apartados.

1.1.3.5 Producción de Glucanos cíclicos.

Los glucanos cíclicos son polímeros de glucosa unidas por enlaces β (eventualmente pueden contener enlaces α), con un grado de polimerización de 17 a 40 glucosas [65].

El primer reporte de la presencia de los glucanos cíclicos, proviene del año 1942 donde se aíslan del medio extracelular de *A. tumefaciens*. Desde entonces los glucanos cíclicos han sido aislados en todas las especies de *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Se los encuentra asociados a las células (en el espacio periplásmico) y también se los secreta al medio extracelular.

En *Agrobacterium* y *Sinorhizobium* los glucanos cíclicos están formados por uniones de tipo β-(1,2). El glucano cíclico es neutro, pero también se lo puede encontrar sustituido con sustituyentes aniónicos, siendo el más frecuente el fosfoglicerol [65]; esto les confiere carga neta negativa. Los glucanos cíclicos

producidos por estas bacterias pueden alcanzar concentraciones tan altas como del 5% al 20% del peso seco de la bacteria [65]. En la Figura 1.6 se muestra la estructura de un glucano cíclico β-(1,2).

.

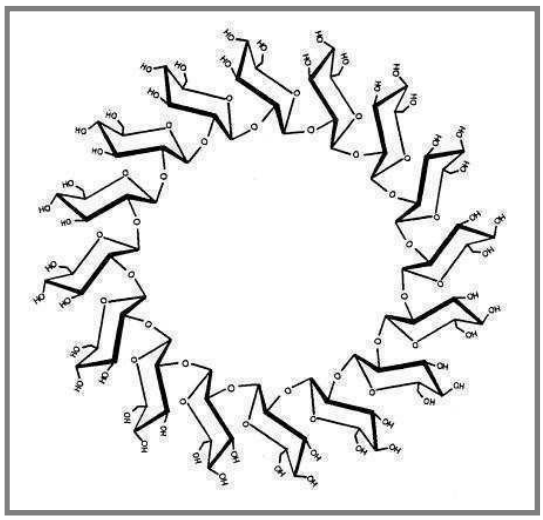


Figura 1.6: Estructura de un glucano cíclico β-(1,2).Tomado de [66].

Mutantes de *Sinorhizobium meliloti* que no producen glucanos cíclicos forman pseudonódulos blancos no fijadores de nitrógeno en raíces de alfalfa. No se establece una infección exitosa, al parecer porque el simbionte es rechazado por los mecanismos de defensa de la planta [67]. Para un desarrollo exitoso del nódulo, es necesario que no se monte una defensa contra el simbionte. Se desconoce cómo el simbionte bloquea esta respuesta, sin embargo, se ha propuesto que los glucanos cíclicos podrían tener un rol en este evento [68].

En acuerdo con un posible rol de los glucanos cíclicos en la supresión de las defensas del hospedador, se ha demostrado que la producción de glucanos cíclicos se mantiene aún después de haberse desarrollado el nódulo. Ya que en el nódulo el oxígeno es limitante y la fijación de nitrógeno demanda mucha energía, la bacteria no desviaría parte de sus recursos a la producción de glucanos cíclicos si esto no fuera indispensable para su supervivencia en la planta.

Las mutantes de *Agrobacterium* defectivas en la producción de estos compuestos son avirulentas, se propuso que el motivo podría ser una desestabilización de la proteína VirB10, implicada en la transferencia del plásmido Ti [69]. También se ha

demostrado que las mutantes presentan formas inactivas de una proteína de membrana externa denominada rhicadhesina que participa en la adhesión a la superficie celular del hospedador [70].

Los glucanos cíclicos se acumulan en el periplasma como compuestos osmocompatibles y cumplen un rol en la adaptación hipoosmótica. Las mutantes de *Sinorhizobium meliloti* no pueden crecer en medio hipoosmótico [71]. Estos datos sugieren que las mutantes incapaces de sintetizar glucanos cíclicos, presentan un fenotipo pleiotrópico.

De esta manera, las conclusiones en cuanto el rol de los glucanos cíclicos en la interacción con el hospedador, obtenidas con este tipo de mutantes deben ser tomadas con cautela, ya que la no virulencia puede estar ligada al pleiotropismo de las mutantes *per se* y no a un posible rol del glucano cíclico interactuando con la planta [72].

1.1.4 El Género *Xanthomonas*.

El género *Xanthomonas* está constituido por 20 especies que atacan a más de 350 vegetales, entre ellos crucíferas, pimiento, arroz, maíz, trigo, soja, algodón, mandioca, frutilla y la mayoría de los cítricos [73]. Causan una variedad de síntomas que abarcan la necrosis, gomosis y enfermedades vasculares o parenquimáticas en hojas, tallos o frutos, produciendo bajas considerables en los rendimientos de los cultivares infectados [73].

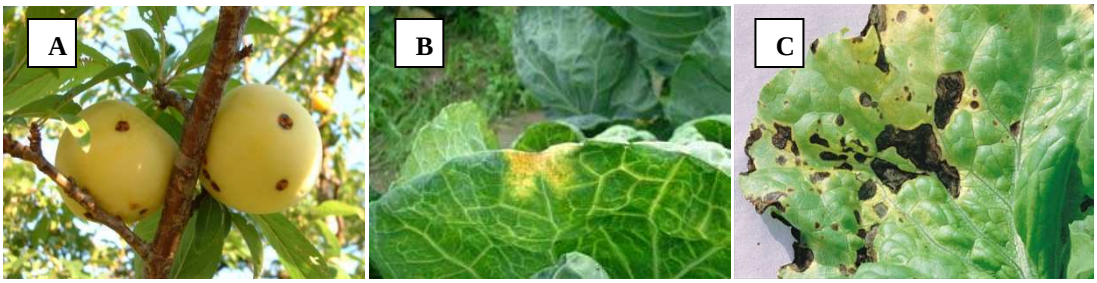


Figura 1.7: A- Lesiones en fruto de ciruelo ocasionadas por *Xanthomonas arborícola* pv. *pruni* B- Mancha en "V" en repollo causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* C- Infección de hoja de lechuga por *Xanthomonas campestris* pv. *vitians.*

En la Figura 1.7 se muestra el daño producido por bacterias del género *Xanthomonas* a algunos cultivares de importancia comercial.

El rango de hospedadores de cada patovariedad está limitado a una o pocas especies o géneros dentro de una familia vegetal (si bien puede ser más amplio debido al poco conocimiento de la interacción con plantas sin importancia comercial).

Las bacterias de este género (Figura 1.8) son bacilos aerobios obligados móviles (de 0,2-0,6μm por 0,8-2,9μm), solitarios o filamentosos, sin estados latentes, y rodeados por un polisacárido extracelular denominado xantano [73].

La mayoría de las cepas forman en medio rico pigmentos amarillos insolubles (xanthomonadinas) unidos a la membrana celular. Asimismo, son productoras de una importante cantidad de enzimas degradativas, que juegan un papel importante durante la infección como glucosidasas, galactosidasas, mannanasas, hidrolasas de almidón, ligninasas, quitinasas, celulasas y pectinasas [73].

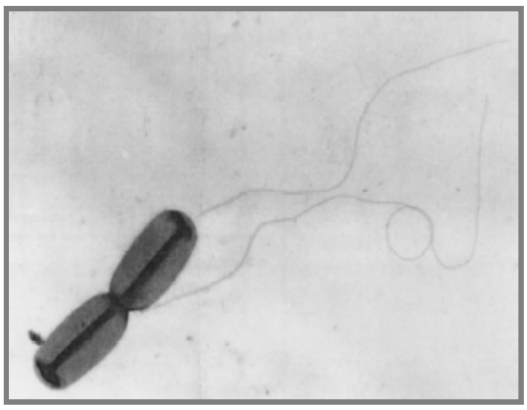


Figura 1.8: Micrografía electrónica de transmisión de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (12000X).

1.2.1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) es el patógeno causante de la putrefacción negra de las crucíferas, enfermedad transmitida vía infección *de novo* o por semilla, que afecta a gran parte de los cultivares de Estados Unidos, Asia, India y África. Es una de las especies más estudiadas hasta la actualidad. Las condiciones óptimas para su crecimiento son altas temperaturas (25-35°C) y humedades (80-100%), por lo que las áreas de cultivo tropicales se ven seriamente afectadas, especialmente en temporada de lluvias [73].

La bacteria ingresa a la planta hospedadora a través de los hidatodos, coloniza la cavidad hidatoidal e invade el sistema vascular de coles o repollos, *Arabidopsis*, nabo y similares, encontrándose predominantemente dentro del xilema [73] lo cual explica la sintomatología de los individuos infectados. Acompañando la multiplicación bacteriana *in planta* se da una degeneración gradual del tejido vegetal. La mayoría de los cultivares muestran lesiones amarillas en forma de V en el margen de la hoja (Figura 1.9), y al extenderse las venas se vuelven negras, pudiendo aparecer manchas cloróticas [73]. Estas lesiones son causadas por la oxidación de fenoles, que resulta en la pigmentación marrón o negra observada, debido a la necrotización de las células vegetales: el plasmalema, lisosomas y tonoplastos se vuelven débiles, y los fenoles de la vacuola (al romperse ésta) reaccionan con oxidasas citosólicas y de membrana [73].

Figura 1.9: Hoja de crucífera (repollo) infectada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris.*

1.2.2 El Glucano Cíclico de *Xanthomonas*.

Xanthomonas produce un glucano cíclico [74], que contiene 16 residuos de glucosas con 15 uniones glicosídicas β-1,2 y una unión α-1,6 (Figura 1.10). En un principio se pensó que solo se sintetizaban glucanos neutros, pero recientemente se reportó la síntesis de un glucano aniónico sustituido con una a dos unidades de fosfoglicerol en *Xanthomonas campestris* pv *campestris* [75]. Estos compuestos pueden encontrarse asociados a la célula o liberados al medio extracelular. Hasta el inicio de esta tesis no se había caracterizado el gen responsable de su biosíntesis.

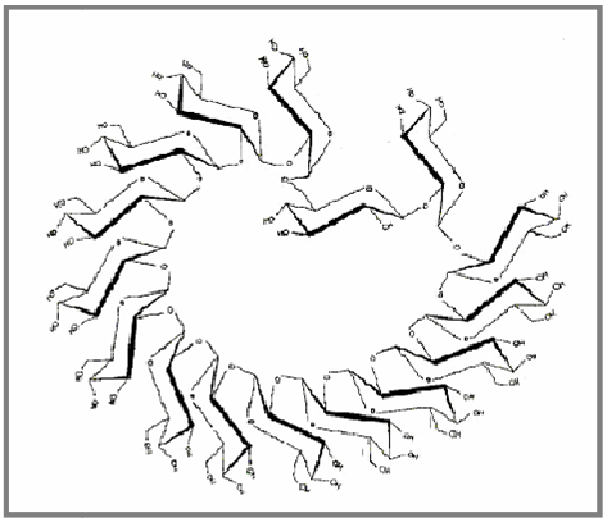


Figura 1.10: Estructura del glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas*. Tomado de [76].

1.2.2.1 Aspectos genéticos de la biosíntesis de Glucanos Cíclicos.

Mutantes en dos regiones de virulencia del genoma de *Agrobacterium*, llamadas *chvA* y *chvB*, mostraron ser menos efectivas en la infección que la cepa silvestre [77]. Más tarde se demostró que la mutante *chvB* era incapaz de sintetizar glucanos cíclicos [78]. Los genes *chvA* y *chvB* mostraron ser homólogos a los genes *ndva* y *ndvB* de *Sinorhizobium meliloti*, involucrados en el desarrollo del nódulo. Asimismo fue posible complementar funcionalmente a las mutantes *chvA* y *chvB* con los genes *ndva* y *ndvB* respectivamente [79]. El producto del gen *ndvA*/*chvA*, codifica una proteína, situada en la membrana plasmática, tiene homología con sistemas de transporte tipo ABC y está involucrado en la translocación del glucano cíclico hacia el periplasma [80]. El gen *ndvB*/*chvB* codifica para una proteína de membrana citoplasmática que incorpora glucosa a un glucano β-(1,2) a partir de UDP-glucosa [81]. Esta proteína es la llamada glucano sintetasa, es interesante notar que sólo la parte N-terminal de esta proteína es necesaria para la síntesis del glucano cíclico [82].

1.2.2.2 Mecanismo propuesto para la biosíntesis.

La síntesis de los glucanos cíclicos se iniciaría por la autoglucosilación de la proteína glucano sintetasa a partir de UDP-glucosa. Luego este intermediario se elongaría por medio de la adición de más unidades de glucosa, hasta alcanzar un grado de polimerización adecuado para la ciclación (que varía con la especie bacteriana). La

ciclación se produciría por la unión de la primera y la última glucosa del intermediario, liberándose el producto final al citoplasma de la bacteria [65]. Los estudios realizados por Williamson *et al*. [83] mostraron que la distribución del tamaño de los glucanos cíclicos β-1,2 en *A. tumefaciens*, resulta de la competencia entre estas reacciones de elongación y ciclación. Luego de ser liberados al citoplasma, los glucanos cíclicos serían secretados al periplasma a través de los sistemas de transporte ya mencionados.

1.3.1 *Xanthomonas citri* subsp *citri*.

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xac*) es uno de los agentes causales de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos (CBC). Desde 1990 esta enfermedad se considera endémica en Argentina afectando inicialmente al Noreste Argentino. Actualmente también se ha expandido al Noroeste Argentino [Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos –SAGPyA, 2004].

Xanthomonas citri subsp. *citri* ingresa a los tejidos jóvenes de hojas, frutos y tallos a través de aperturas naturales o heridas. Las temperaturas óptimas en las que se favorece la enfermedad se encuentran entre 20ºC y 30º C [44]. A su vez, una alta humedad ambiente y lluvias son propicias para que la bacteria emerja de la lesión y con ayuda del viento pueda ser dispersada hacia plantas vecinas [44].

Una vez dentro del tejido vegetal, *Xac* se multiplica localmente en el espacio intercelular o apoplástico. Estudios de microscopía muestran que los cancros se generan a partir de una hiperplasia (división celular) e hipertrofia (expansión celular) del mesófilo esponjoso, donde las bacterias que colonizan el apoplasto entran en contacto con las células vegetales [84]. En dichas regiones, las células vegetales sufren daños severos que incluyen la degradación celular y la disolución de la pared celular lo cual genera fibrillas que se dispersan en los espacios intercelulares y rodean a las bacterias. Infecciones severas pueden causar defoliación, deformación, manchado y abscisión prematura de los frutos, provocando el debilitamiento general del árbol [85] (Figura 1.11).

El incremento excesivo del crecimiento bacteriano induce la ruptura de la epidermis de la hoja y finalmente la necrosis del tejido (Figura 11), causado por la invasión de las bacterias a las células vegetales que se encuentran altamente

vacuoladas y con una membrana plasmática dañada [86]. Este último paso es crucial para la diseminación bacteriana y el inicio de un nuevo ciclo infectivo.

Infecciones severas pueden causar defoliación, deformación, manchado y abscisión prematura de los frutos, provocando el debilitamiento general del árbol [85].

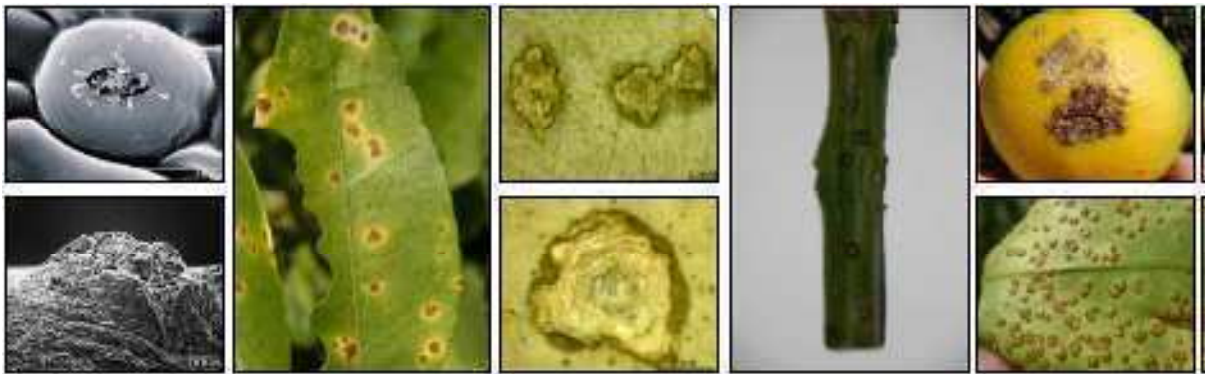


Figura 1.11: Síntomas causados por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en hojas, fruto y tallo de plantas de cítricos.

1.3.2 Distintos tipos de Cancrosis Bacteriana de los Cítricos. Agentes Causales.

La cancrosis bacteriana de los cítricos (CBC) es causada por dos grupos de *Xanthomonas* filogenéticamente diferentes, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), sobre la cual ya se ha discutido en el párrafo anterior y *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* (*Xaa*) [87]. Se han descrito diferentes formas de CBC, causadas por distintos subgrupos o variantes de *Xac* y *Xaa,* en base al rango de hospedador y distribución geográfica del patógeno [44].

La cancrosis A o Asiática es causada por *Xanthomonas citri*, y de los distintos tipos de cancrosis que se conocen es la de mayor virulencia y distribución en el mundo [88]. Afecta a un amplio rango de hospedadores dentro de la familia de las Rutáceas, incluyendo a todas las especies de cítricos. La mayoría de los cultivares de citrus comerciales son moderados a altamente susceptibles a este patógeno, agrupándose como altamente susceptibles a: pomelo, lima mexicana, naranjo trifoliado y sus híbridos; y como moderadamente susceptibles a: limonero, naranjo amargo y naranjo dulce.

En Argentina la cancrosis tipo A apareció en 1973, volviéndose endémica en 1990 en el Litoral y estando confinada sólo a dicha región probablemente hasta marzo de 2002, fecha en que se declararon los primeros focos de infección en las provincias de Salta y Tucumán. Cabe señalar, que en 1996 ingresó a la Argentina el insecto conocido como minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella* Stainton), el cual produce heridas en el tejido, aumentado la diseminación y susceptibilidad a CBC [85].

Una nueva cepa de *Xac*, denominada A*, fue identificada en el sudoeste de Asia, con un rango de hospedador restringido sólo a la lima mexicana [44]. Las lesiones inducidas en esta planta son similares a la cancrosis A. Los ensayos bioquímicos y moleculares confirmaron que la cepa A* pertenece al grupo de X*anthomonas citri* subsp. *citri*.

La Cancrosis B o sudamericana causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B, afecta principalmente a la lima mexicana y limoneros en Argentina, Paraguay y Uruguay. Otros hospedadores susceptibles son el naranjo dulce y el pomelo [44]. Las cepas tipo B, generan cancros similares a las causadas por *Xac*, pero más pequeños.

La Cancrosis C, causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, ha sido aislada de la lima mexicana en una localidad del estado de Sao Paulo, Brasil. El otro hospedador conocido es el naranjo amargo o agrio [85]. Los síntomas inducidos en estas plantas son los mismos que los de tipo B en lima mexicana. En cambio, en limonero, pomelo y naranjo dulce, se induce una respuesta tipo HR.

1.3.3 Importancia social y económica de los cítricos.

En un contexto internacional y de acuerdo con las últimas estadísticas disponibles, los países del hemisferio Norte son los mayores productores de cítricos, con el 58% de la producción mundial. Los países productores más importantes de ese hemisferio son China, Estados Unidos, México y España, mientras que Brasil, Argentina y Sudáfrica son los que se destacan en el hemisferio Sur.

Los cítricos son uno de los cultivos más importantes dentro de la fruticultura nacional. La producción total de cítricos de Argentina es de 2,5 millones de toneladas y abarca 150.000 hectáreas [Foreign Agricultural Service - USDA, 2009-2010; Federación Argentina del Citrus, 2009].

Las zonas de producción en nuestro país pueden diferenciarse en cuatro zonas bien definidas; la región I–Noreste (NEA), que se caracteriza por ser la zona cítrica más tradicional de Argentina, y que abarca las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones; la región II–Central, que corresponde al sector limítrofe entre las provincias de Buenos Aires y Santa Fe; la región III–Noroeste (NOA), que comprende las zonas productoras de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja y la región IV-Norte, que involucra áreas de las provincias de Formosa y Chaco.

En el NEA predominan los cultivos de naranjas y mandarinas mientras que en el NOA, se producen principalmente limones, pomelos, y naranjas [Foreign Agricultural Service - USDA, 2009-2010; Federación Argentina del Citrus, 2009].

Los cítricos producidos en Argentina se comercializan en más de 80 mercados, siendo la Unión Europea el principal comprador. En los últimos tiempos ha crecido la demanda de Rusia, que se consolida como el segundo mercado de importancia [Federación Argentina del Citrus, 2009].

Argentina es el mayor productor, procesador e industrializador de limón a nivel mundial, y el 88% de su producción se encuentra en la provincia de Tucumán [Federación Argentina del Citrus, 2008]. Un alto porcentaje de la producción se destina a la elaboración de jugos concentrados, aceites esenciales y cáscara deshidratada y el restante se comercializa como fruta fresca.

Es importante destacar, que la producción de fruta fresca de limón ha logrado abrir las fronteras de los mercados de Estados Unidos y Japón, conocidos por las altas exigencias que imponen al ingreso de productos en sus territorios. Sin embargo, los países compradores se vuelven cada vez más exigentes en el cumplimiento de estándares de calidad, inocuidad y trazabilidad como son las buenas prácticas de agricultura, manufactura, etc., además de una tolerancia mínima en cuanto al uso de determinados productos químicos y altos requerimientos fitosanitarios para la comercialización de los cítricos.

1.3.4 Manejo de la enfermedad.

Hay cuatro principios para el control de la enfermedad: exclusión, erradicación, protección y resistencia. En las regiones donde aparecen nuevos brotes de CBC, la

aplicación inmediata de programas de erradicación pueden resultar exitosos. Sin embargo, en Argentina, Brasil, Uruguay y Florida, los intentos de erradicación han sido poco efectivos y no han podido impedir la expansión de la enfermedad [85, 89] .

En las regiones del mundo donde CBC es considerada endémica, deben implementarse programas de manejo integrado. En las provincias Argentinas de Entre Ríos, Corrientes y Misiones comenzó a practicarse el sistema de "convivencia con la enfermedad" que consiste en la selección de variedades poco susceptibles, producción de plantas libres de la enfermedad en viveros, en combinación con pulverizaciones con productos cúpricos y prácticas culturales como plantación de cortinas rompevientos, control de plagas como el minador de los cítricos y saneamiento de herramientas y equipos.

1.3.5 Biofilms Bacterianos.

En los ecosistemas naturales, los microorganismos crecen preferentemente adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo, formando biofilms [90, 91].

Los biofilms microbianos se definen como conglomerados de células inmovilizadas en una matriz de polímeros orgánicos de origen microbiano, con polisacáridos extracelulares como principal constituyente, junto con proteínas, lípidos y ácidos nucléicos [90, 91].

Las bacterias que crecen en los biofilms poseen una fisiología diferente de aquellas células de vida libre (planctónicas). Generalmente viven bajo limitaciones nutricionales, las cuales pueden promover el intercambio de material genético y aumentar la diversidad genética, generando ventajas evolutivas [92].

Cabe destacar que, si bien la formación de biofilms es un proceso energéticamente costoso, se sabe que la vida en comunidad protege a las bacterias de condiciones ambientales adversas, como la desecación, temperaturas elevadas, presencia de antibióticos y compuestos antimicrobianos, además de los mecanismos de defensa del hospedador [90, 93, 94].

La formación de biofilms es un proceso que tiene diferentes etapas (Figura 1.12); al comienzo de este evento, las bacterias se encuentran débilmente adheridas a la superficie pudiendo moverse sobre ella utilizando estructuras tales como el flagelo (Figura 1.12-1). Luego, esta unión se intensifica y las bacterias comienzan a

experimentar cambios en su expresión genética [95, 96]. Hay un aumento en la producción de exopolisacáridos y en general se pierden los apéndices utilizados para la movilidad (Figura 1.12-2).

El próximo paso es el desarrollo de microcolonias (Figura 1.12-3), proceso que involucra al menos tres mecanismos diferentes; las células unidas a la superficie se redistribuyen mediante el movimientos de corta distancia, un segundo mecanismo es el de la división binaria, a medida que las células se van duplicando las células hijas se van ubicando de manera tal de formar grupos de células adheridas entre ellas y al sustrato. Una tercera forma del aumento en tamaño de las microcolonias es a través del reclutamiento de células que se encuentran libres en el medio.

El tiempo que tarda un biofilm en desarrollarse y volverse maduro depende del microorganismo en estudio, del medio y de la superficie utilizada. Un biofilm maduro se caracteriza por poseer canales de agua por donde pasan los nutrientes y los desechos que utilizan las bacterias que habitan su interior.

Las microcolonias se transforman en macrocolonias (Figura 1.12-4,5) y algunas células (de forma individual o en grupo) pueden ser liberadas nuevamente al medio. El desprendimiento activo es un evento fisiológico que se encuentra regulado [97]. Las bacterias liberadas al medio vuelven a poseer las características que tenían antes de formar parte del biofilm, y pueden moverse para establecer nuevos biofilms en ubicaciones distales.

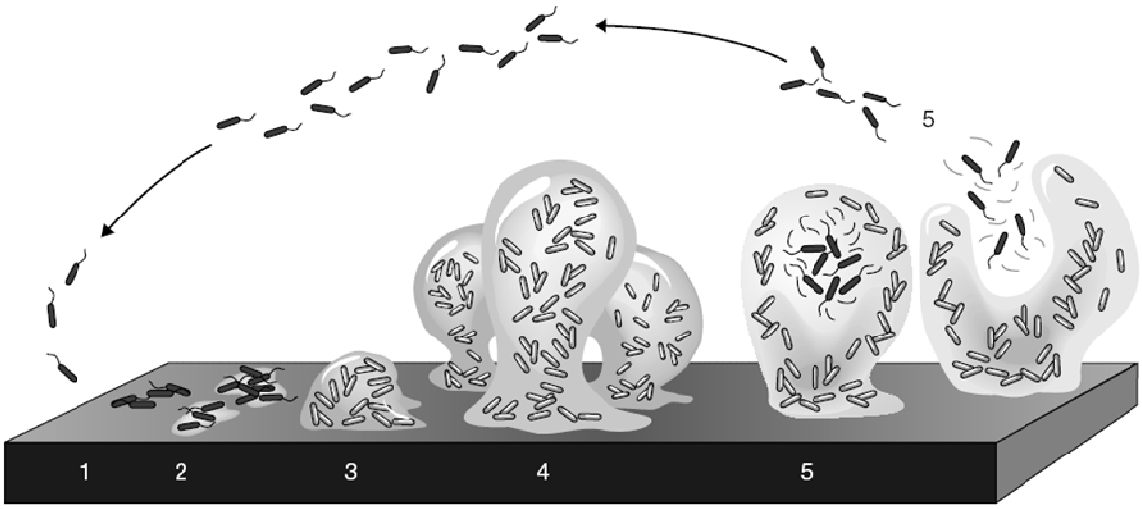


Figura 1.12: Distintas etapas en la formación de un biofilm bacteriano. Modificado de [98].

Como se ha comentado en los anteriores párrafos, los polímeros extracelulares producidos por las bacterias son requeridos para la formación de biofilms, jugando un papel esencial en el desarrollo de estas estructuras [94, 99, 100] .

Se ha establecido una asociación entre la capacidad de formar biofilms y la virulencia en una significativa cantidad de infecciones bacterianas crónicas en humanos [91, 101, 102], sin embargo pocos estudios han ahondado en el rol de este tipo de comportamiento en las enfermedades bacterianas en plantas [64, 103].

1.3.6 Exopolisacárido producido por *Xanthomonas*.

Las bacterias del género *Xanthomonas* producen un exopolisacárido llamado xantano (Figura 1.13 A), la biosíntesis de este exopolisacárido está particularmente bien estudiada en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ya que esta cepa se utiliza para su producción con fines comerciales.

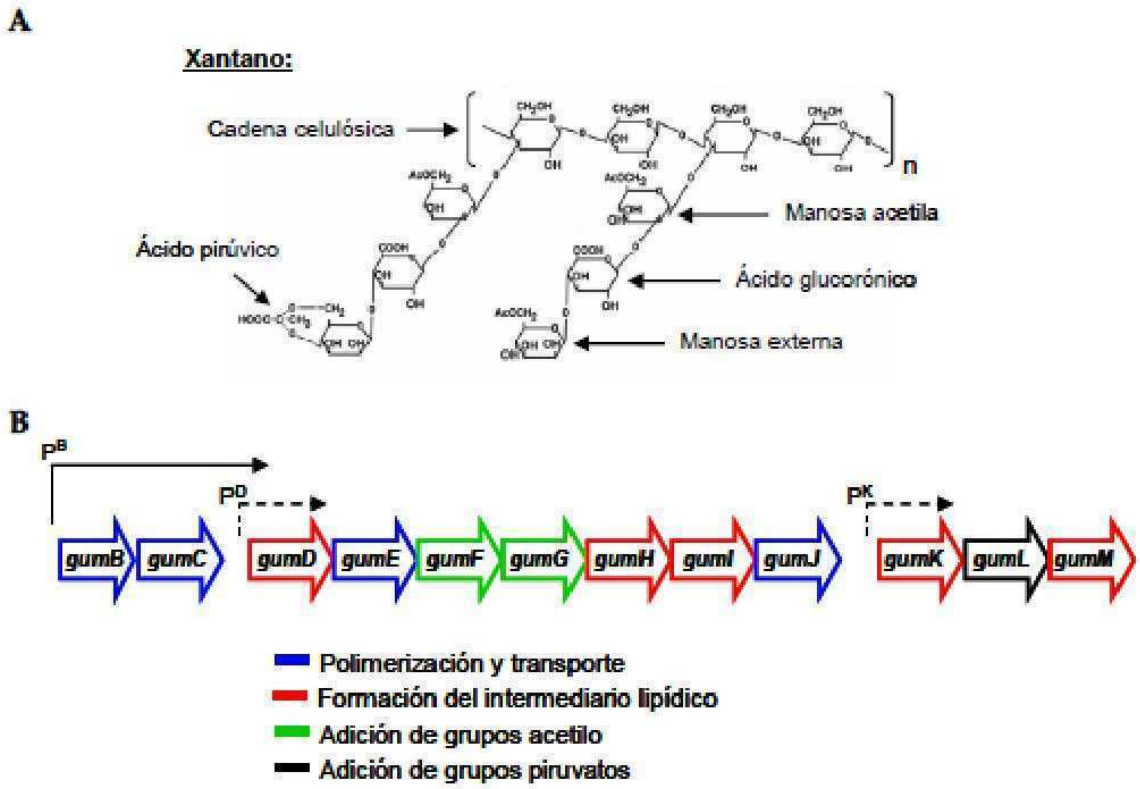


Figura 1.13: *Cluster* de genes gum involucrado en la síntesis de xantano en *Xanthomonas*. A- Estructura química del xantano. B- *Cluster* de genes *gumB-M* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. P^B: promotor situado río arriba del gen gumB. P^D: promotor débil situado río arriba del gen gumD. P^K: promotor débil situado río arriba del gen gumK.

El xantano es un heteropolisacárido con una estructura conformada por una cadena principal celulósica sustituida cada dos unidades de D-glucosa por una cadena lateral de trisacáridos de D-manosa y ácido D-glucorónico en relación molar 2:1. En *Xcc* la síntesis de intermediarios lipídicos, ensamblaje y exportación del xantano está codificada por 12 genes denominados *gumB, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L* y *M* [104].

Estos genes se encuentran organizados dentro de un "*cluster*" de 12-kb que se expresa principalmente como un operón (Figura 1.13 B), desde un único promotor localizado río arriba del primer gen, *gumB* [105, 106]. También se han identificado promotores secundarios para el gen *gumK* [105] y *gumD* [107].

Comparando los genomas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris y Xanthomonas citri* subsp. *citri*, se pudo determinar que el "*cluster*" de genes *gum* se encuentra altamente conservado en estas cepas, tanto en composición, tamaño y orden génico, como en dirección de la transcripción [108], por lo que los conocimientos generados en *Xcc* serian aplicables a *Xac*.

1.4.1 Metodologías utilizadas para la detección de bacterias fitopatógenas.

La Cancrosis bacteriana de los cítricos, por ser una enfermedad endémica, es uno de los principales problemas que tiene la citricultura Argentina para acceder a los mercados externos. Así por ejemplo, en el año 2003, España prohibió el ingreso de los cítricos argentinos tras haber detectado partidas con enfermedades cuarentenarias, y pidió que el resto de los países de la UE se sumara a la medida. A raíz de esto se establecieron numerosas medidas de control fitosanitarias a las cuales se debe ajustar la producción Argentina de cítricos.

El éxito de los programas de control de las enfermedades vegetales depende en gran manera de la detección temprana de los focos de infección. Para los programas de control es necesario disponer de métodos de diagnostico que sean eficientes, económicos y rápidos.

En la actualidad el diagnóstico de las enfermedades de las plantas se lleva a cabo en algunos casos que incluyen a la Cancrosis de los Cítricos, por métodos microbiológicos clásicos, los cuales son lentos e implican mucho trabajo manual [109].

También se utilizan métodos serológicos, como el Enzyme Linked Inmunoadsorbent Assay (ELISA) o inmunotinciones, pero estos métodos tienen la desventaja de presentar a menudo reacciones cruzadas de los anticuerpos, y los problemas asociados a la producción de los anticuerpos [109].

Las técnicas de biología molecular como la PCR y su variante en tiempo real se están empezando a usar con éxito para el diagnóstico de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos [109-114], ya que son altamente sensibles y específicas. Sin embargo el problema con el que tienen que lidiar estas técnicas es que requieren de equipamiento complejo y personal especializado para su manejo [115].

Para realizar tales controles y seguimientos de la enfermedad en nuestras plantaciones es de vital importancia contar con métodos de diagnóstico de la enfermedad que sean efectivos y relativamente fáciles de ser llevados a cabo y que se puedan usar en lugares remotos, sin disponibilidad de equipamiento sofisticado ni personal especializado.

1.4.2 *Loop Mediated Isothermal Amplification*.

Esta reacción que se denomina en ingles *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), fue desarrollada por Notomi y colaboradores en el año 2000 [116].

Es una metodología que amplifica ADN con una gran sensibilidad, eficiencia y rapidez, bajo condiciones isotérmicas [116]. La LAMP se basa en el principio de síntesis por desplazamiento de la cadena de ADN llevada a cabo por la enzima Bst ADN polimerasa, y por lo tanto a diferencia de las PCR no hay necesidad de desnaturalizar el ADN molde [116].

La reacción se mantiene en el tiempo por un proceso de autociclado mediado por loops inducidos en la estructura del ADN. La técnica usa de 4 a 6 cebadores que reconocen seis a ocho regiones en el ADN blanco, proporcionando una especificidad mayor a la de la PCR [116, 117]. La amplificación se puede llevar a cabo a una temperatura constante de 60 a 65 grados centígrados y produce grandes cantidades de ADN. La LAMP muestra una gran tolerancia a contaminantes presentes en las

muestras a analizar, problema común en la PCR que da lugar a resultados falsos negativos [118].

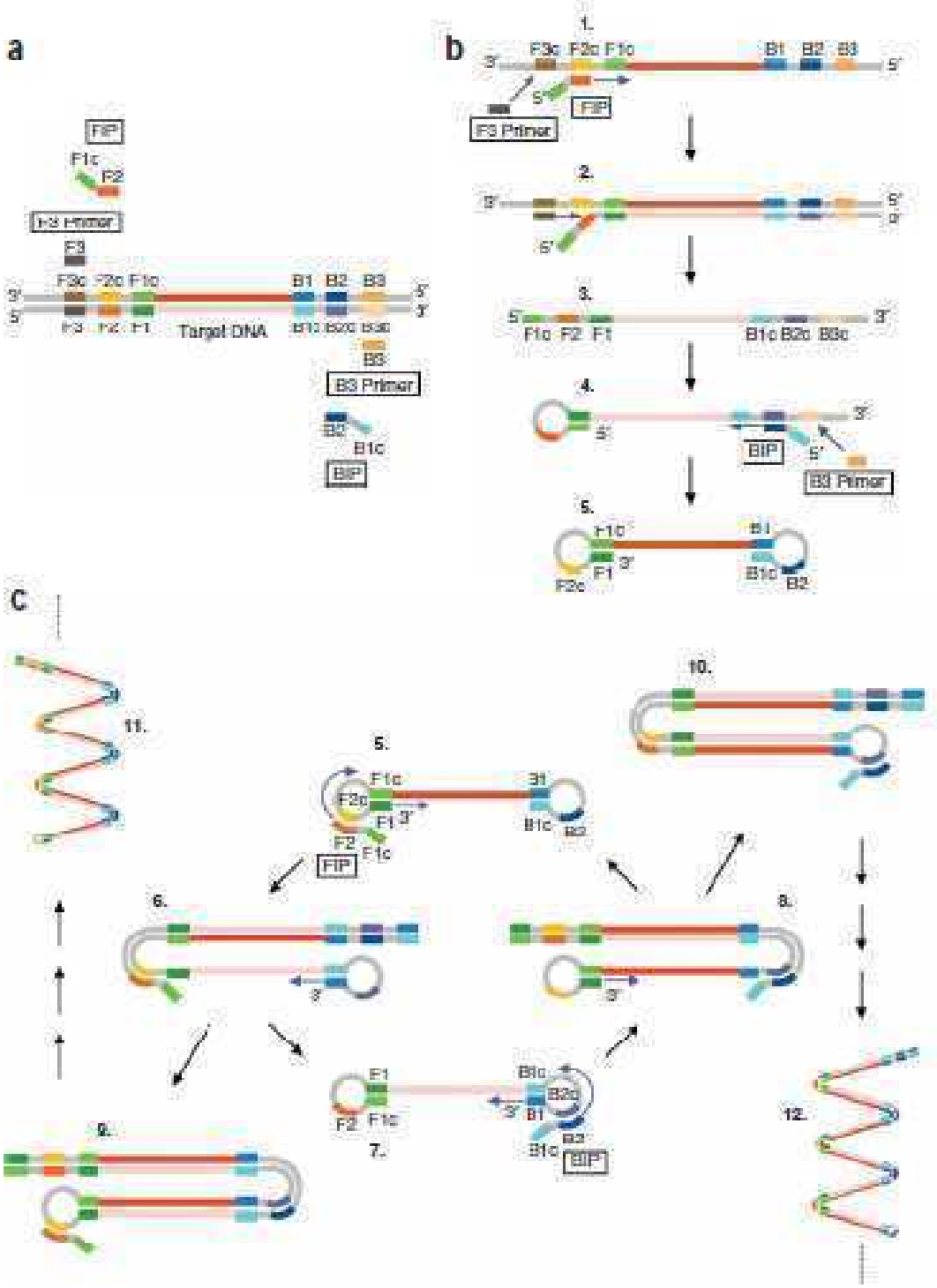


Figura 14: Esquema de la reacción de amplificación LAMP. A- Diseño de cebadores sobre el ADN blanco. B- Proceso mediante el cual se forma la estructura de autociclado. C- Paso de autociclado, que por medio de varios ciclos genera estructuras de longitud creciente. Tomado de [119].

El resultado de esta reacción es una serie de productos formados por copias invertidas de la secuencia blanco con distinto número de copias formando un patrón de escalera típico al correr la reacción de amplificación en un gel de agarosa. Un esquema de la reacción se muestra en la Figura 1.14.

La gran ventaja de este método sobre otros como la PCR es que no se necesita de un ciclador térmico para ser llevado a cabo, solamente es necesario un baño térmico que pueda mantener la temperatura constante.

1.5.1 Objetivos generales:

En esta tesis se propone estudiar las bases moleculares de la patogénesis de bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas*, en particular se estudiarán algunos aspectos de la interacción entre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas* citri *subsp*. *citri* con sus respectivos hospedadores mediante el uso de diversos abordajes. Los resultados obtenidos en este estudio brindarán una base para comenzar a desarrollar distintas alternativas biotecnológicas capaces de generar cultivares resistentes a este tipo de agentes patógenos.

1.5.2 Objetivos específicos:

1- Estudiar el rol del glucano cíclico de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la interacción con su hospedador.
2- Estudiar el rol del exopolisacárido xantano de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en la formación de biofilms y el rol de la formación de biofilms en la supervivencia epifítica de la bacteria y en el desarrollo de la enfermedad.
3- Desarrollar un método de diagnóstico para la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos que tenga la potencialidad de ser llevado a cabo en condiciones de campo.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Cepas Bacterianas utilizadas.

Las cepas de *Escherichia coli* y *Xanthomonas* spp. utilizadas en este estudio se detallan en la Tabla 2.1*.

Tabla 2.1: Cepas Bacterianas.

Cepa	Características Relevantes	Referencia-Fuente
Escherichia coli		
DH5α	Cepa de clonado	Gibco BRL.
Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*)		
8004	Cepa silvestre.	Dr. Max Dow.
ndvB $^{-}$	Cepa 8004 con el gen *ndvB* interrumpido por un cassette (Ω) de resistencia a espectinomicina.	Esta tesis. [120].
ndvB $^{+}$	Cepa mutante *ndvB*::Ω complementada (+pBBR1*ndvB*).	Esta tesis. [120].
Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xac*)		
306	Cepa silvestre.	[121].
gumB^{-}	Cepa 306 con el gen *gumB* interrumpido por un cassette (Km^R) de resistencia a kanamicina.	Esta tesis. [122].
gumB $^{+}$	Cepa mutante *gumB*::Km^R complementada con el plásmido pIZD15-261 que contiene el *cluster* completo de genes *gum* de la cepa *Xcc* 8004.	Esta tesis. [122].
306-GFP	Cepa silvestre que expresa la proteína GFP.	Esta tesis. [122].
gumB^{-}-GFP	Cepa mutante *gumB*$^{-}$ que expresa la proteína GFP.	Esta tesis. [122].

*: Las cepas bacterianas utilizadas en la validación del método de detección de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos se listan en el capítulo correspondiente con el fin de evitar repetir la información.

2.2 Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados en esta tesis y sus características de se detallan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Plásmidos.

Plásmido	Características Relevantes	Referencia
pGEM®-T-Easy	Amp^R, permite el clonado de productos de amplificación.	Promega (EE.UU).
pJQ200KS	Vector suicida *sacB* (también llamado pSAC en esta tesis.	[123].
pHP45Ω	Cassette Ω de resistencia a espectinomicina clonado en pHP45.	[124].
pBBR1MCS-2	Plasmido replicativo en *Xanthomonas* utilizado para complementaciones.	[125].
pMP2444	pBBR1MCS-5 conteniendo el gen que codifica para la proteína verde fluorescente.	[126].
pIZD15-261	pLAFR conteniendo el "cluster" completo *gumB-M* de *Xcc* 8004. Tc^R.	[127]
pSAC::*gumB*::Kn	pJQ200KS conteniendo un fragmento del gen *gumb* de *Xac* interrumpido por un cassette de Kn^R.	Esta tesis. [122].
pSAC::*ndvB*::Ω	pJQ200KS conteniendo un fragmento del gen *ndvB* de *Xcc* interrumpido por un cassette Ω.	Esta tesis. [120].
pBBR1::*ndvB*	pBBR1 conteniendo una copia del gen *ndvB* de *Xcc* para complementación.	Esta tesis. [120].

2.3 Oligonucleótidos utilizados.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se detallan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Uso	Referencia
Xcc ndvB fwd	CAATCTCCGCATCGTCCTTGG	Mutagenesis	Esta Tesis. [120].
Xcc ndvB rev	GTCGGCGGGGATGAAGAACA	Mutagenesis	Esta Tesis. [120].
Xcc C-*ndvB* fwd	CCTCAATCCTCAACACTGCG	Compl.	Esta Tesis. [120].
Xcc C-*ndvB* rev	TGTGATAGTCGTCGGCATCG	Compl.	Esta Tesis. [120].
Xac gumB fwd	AGTTACGTGTTGGCGATCTTGGC	Mutagénesis	Esta Tesis. [122].
Xac gumB rev	AATGGCGTGCGGTCTCTTTC	Mutagénesis	Esta Tesis. [122].
CBC-F3	GGTGGATCTACGCACGC	LAMP	Esta Tesis. [115].
CBC-B3	GCTGCGATCATGTCCTGAT	LAMP	Esta Tesis. [115].
CBC-FIP	GGTGCTGCGCCACTGTCGAA-GCTACAGCCAGCAGCAACA	LAMP	Esta Tesis. [115].
CBC-BIP	GCACTGGTCGGCCATGGGTA-GCGACGGTCCCTAACG	LAMP	Esta Tesis. [115].
CBC-LF	AACCTTCGGTTTGATCTTCTCC	LAMP	Esta Tesis. [115].
CBC-LB	TTACACACGCGCACATCGT	LAMP	Esta Tesis. [115].

2.4 Conservación de cepas bacterianas.

Como método de conservación de bacterias se utilizó el almacenamiento con glicerol, que permite mantener la viabilidad de los organismos durante varios años, a –80 °C. Para este propósito, se almacenaron en criotubos estériles conteniendo:

- 1ml de cultivo de bacterias cultivadas en medio líquido con antibiótico durante una noche.
- 0.5ml de Glicerol 60% (concentración final 20%).

2.5 Condiciones de crecimiento.

Las suspensiones bacterianas de las distintas cepas conservadas en glicerol 20% fueron transferidas asépticamente a 10 ml del medio líquido correspondiente e incubadas durante 24-48 hs a 28°C para *Xanthomonas* o 37°C pare *E. coli* con agitación circular (200 RPM). Se plaquearon alícuotas de dichos cultivos en medio sólido con el respectivo antibiótico, incubándose durante 24-48 hs. Al cabo de este tiempo se llevaron a 4°C. A partir de estas placas se efectuaron repiques cada tres semanas con el fin de disponer de células frescas para cada experimento.

2.6 Medios de cultivo.

Para el cultivo de las distintas cepas bacterianas se utilizaron los siguientes medios:

Xanthomonas

a) MC -Cadmus [128].

Componente	**% p/v**
Glucosa	1,0
Peptona	0,5
Ext. de levadura	0,3
Ext. de malta	0,3

b) Medio Mínimo [129].

Componente	**Concentración**
Glucosa	10 g/l
K_2HPO_4	10,5 g/l
KH_2PO_4,	4,5 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	4,1 g/l
Citrato de sodio	0,5 g/l
Hidr. de caseína	1,5 g/l
$MgSO_4$	1 mM

E. coli

b) Luria-Bertani:

Componente	**% p/v**
Triptona	1,0
Ext. de levadura	0,5
NaCl	0,5

c) SOC:

Componente	**Concentración**
Triptona	20 g/l
Ext. de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
KCl	0,01 g/l
$MgSO_4$	10mM
Glucosa	20mM
$MgCl_2$	10mM

Para el crecimiento bacteriano en medio sólido se utilizaron las mismas fórmulas adicionando 2% agar.

2.7 Antibióticos utilizados.

Los antibióticos utilizados y su concentración final se detallan en la siguiente tabla:

Antibiótico	**Concentración**
Rifampicina	25 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml
Ampicilina	200 µg/ml
Gentamicina	20µg/ml
Spectinomicina	200µg/ml
Estreptomicina	20µg/ml

2.8 Plantas y condiciones de crecimiento utilizadas.

Nicotiana benthamiana:

Las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron sembradas en ágar 0,8% en luz continua hasta obtener plántulas de dos hojas, y luego fueron trasplantadas a tierra y crecidas en invernáculo a 23°C sometiéndolas a un fotoperiodo de 16 hs luz/8 hs oscuridad. Se seleccionaron individuos de ocho semanas para los ensayos.

Arabidopsis thaliana:

Semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) fueron germinadas en agar 0,8% luz continua luego de un shock de 4°C-oscuridad de tres días. A continuación se trasplantaron a macetas conteniendo una mezcla de turba:perlita:vermiculita 1:1:1. Las macetas se cubrieron con una malla del tipo mosquitero plástico para facilitar el proceso de infección por *dipping*. Se tallaron orificios en la malla para permitir que las plantas crezcan por sobre la misma. Las plantas se crecieron en invernáculo a 23°C sometiéndolas a un fotoperiodo de 16 hs luz/8 hs oscuridad. Se seleccionaron individuos de 4-5 semanas para los ensayos.

Citrus limón:

Plantas de limonero (*Citrus limón*) variedad Eureka se crecieron en invernadero con un rango de temperatura entre 20 - 25°C. Sometiéndolas a un fotoperiodo de 16 hs luz/8 hs oscuridad

2.9 Inoculación de plantas con suspensiones bacterianas y compuestos purificados.

El método de inoculación utilizado fue diferente dependiendo del vegetal a ser inoculado, a continuación se detallan las distintas especies vegetales y los métodos de inoculación utilizados en cada caso.

Nicotiana benthamiana:

Inoculación por infiltración:

Se crecieron cultivos en medio líquido de las distintas cepas a inocular durante 24hs, se centrifugó a 7.500 RPM durante 10 min. El sedimento se resuspendió en una solución 10 mM $MgCl_2$ llevándose a una concentración bacteriana de 10^7 ufc/ml. Luego

se efectuaron las inoculaciones, apoyando sobre la cara abaxial de la hoja una jeringa sin aguja conteniendo la suspensión bacteriana y ejerciendo una suave presión sobre el émbolo de la jeringa, de modo de introducir la suspensión en la hoja. En el caso de inoculación con compuestos purificados de utilizó el mismo procedimiento.

Cuantificación de la población bacteriana en la planta inoculada:

Para evaluar el desarrollo bacteriano en las plantas de *Nicotiana benthamiana*, para cada tiempo a muestrear, se tomaron 2 discos de 0,67 cm^2 por hoja tratada, y se efectuó el siguiente protocolo en campana de flujo laminar:

1. Triturado del material vegetal (con homogenizador) en 0,5ml de agua estéril.
2. Diluciones de dicha suspensión en agua estéril (por duplicado)
3. Plaqueo de 100µl de dilución en medio Cadmus con el antibiótico respectivo
4. Incubación a 28°C por 48hs
5. Conteo de colonias y cálculo de las UFC totales y UFC/cm^2

Arabidopsis thaliana:

Inoculación por *dipping*:

Se crecieron cultivos en medio líquido de las distintas cepas a inocular durante 24hs, se centrifugó a 7.500 RPM durante 10 min. El sedimento se resuspendió en una solución 10 mM $MgCl_2$ y 0,02% Silwet L-77 llevándose a una concentración bacteriana de 10^7 ufc/ml. Las infecciones se realizaron por el método de *dipping* descripto anteriormente [130]. Explicado de manera breve: se sumergieron las macetas conteniendo plantas de 4-5 semanas de edad en las soluciones bacterianas preparadas anteriormente por un periodo de 30 segundos. Los potes fueron cubiertos con un envoltorio transparente durante 24 hs para conservar la humedad y favorecer la apertura estomática necesaria para el ingreso de las bacterias. En el caso de inoculación con compuestos purificados de utilizó el mismo procedimiento pero se lo complementó con la aplicación de vacío.

Cuantificación de la población bacteriana en la planta inoculada:

Luego de recolectar las plántulas se colocaron en una solucion de 10mM $MgCl_2$, se pesaron y se trituró el tejido vegetal. Las suspensiones bacterianas resultantes

fueron diluídas serialmente al décimo en placa multipocillo y se realizó un goteo de las mismas (gotas de 5µl) en placas de medio Cadmus agar con los respectivos antibióticos. Se incubaron éstas a 28°C por 48hs, y se calcularon las UFC totales y en función del peso de tejido fresco.

Citrus limón:

Inoculación:

Se crecieron cultivos en medio líquido de las distintas cepas a inocular durante 24hs, se centrifugó a 7.500 RPM durante 10 min. El sedimento se resuspendió en una solución 10 mM $MgCl_2$ llevándose a una concentración bacteriana de 10^6 ufc/ml. La suspensión bacteriana fue inoculada utilizando diferentes métodos de infección según el ensayo:

Inoculación por infiltración:

Se apoya sobre la cara abaxial de la hoja una jeringa sin aguja conteniendo la suspensión bacteriana y ejerciendo una suave presión sobre el émbolo de la jeringa, de modo de introducir la suspensión en la hoja.

Inoculación por aspersión:

Utilizando un atomizador se rocía el inóculo sobre la superficie foliar, principalmente sobre la cara abaxial por su mayor número de estomas. Este método de inoculación es el que se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza, ya que las bacterias sólo pueden ingresar al mesófilo por los estomas.

Inoculación por herida y aspersión:

En este caso, previamente a la inoculación por aspersión, se realiza una herida de aproximadamente 1 cm en cada lóbulo de la cara abaxial de la hoja.

Independientemente del método de inoculación utilizado, las hojas inoculadas se recubren con una bolsa de nylon previamente humedecida con agua estéril para mantener la humedad ambiente alta y así favorecer el desarrollo de la enfermedad.

Cuantificación de la población bacteriana en la planta inoculada:

En el caso de *Citrus limón*, el número de bacterias viables en las hojas se determinó de dos maneras, dependiendo de la población bacteriana que se quisiera evaluar:

Población total:

A diferentes tiempos post inoculación, se cortaron discos de hojas de aproximadamente 1 cm^2. Los discos se sumergieron en 500 µl de una solución 10 mM $MgCl_2$ y las células bacterianas se liberaron a la solución por la homogenización del tejido con un palillo plástico estéril. Posteriormente, se plaquearon en medio Cadmus diluciones seriadas de la suspensión para estimar el tamaño total (apoplasto + epifítica) de la población bacteriana.

Población epifítica:

Método basado en la técnica descrita por Morris y colaboradores [131]. Para ello, se seleccionaron al azar tres discos de hojas infectadas y se sumergieron en una solución 10 mM $MgCl_2$. Se agitaron los tubos conteniendo los discos de hojas a temperatura ambiente durante 2 min. De esta manera se logró liberar las bacterias adheridas a la superficie de la hoja sin aislar las que se encuentran dentro del apoplasto vegetal. Se plaquearon en medio Cadmus diluciones seriadas de la suspensión para estimar el número de células de la población bacteriana.

Pretratamientos con glucano purificado:

Los pretratamientos con glucano purificado se realizaron siguiendo la misma metodología mencionada anteriormente para cada especie vegetal, siendo inoculada en este caso una solución de glucano cíclico β-(1,2) purificado de la concentración adecuada para cada experimento en cuestión. Luego de este pre-tratamiento, se esperaron 24 horas antes de infectar con las cepas bacterianas.

Inoculación y Recuperación de ^{14}C-glucanos:

Se inocularon 500 µl de una solución de ^{14}C-glucanos (40.000 CPM-68 pmoles), mediante la misma metodología para inocular suspensiones bacterianas que se detalló anteriormente. Esta inoculación se realizó en una hoja, la cual fue rotulada como “hoja

inoculada". A continuación, y a distintos tiempos post-inoculación, se monitoreó la diseminación del compuesto marcado a través de la planta.

Esto se realizó tomando discos de 0,38 cm^2 de tejido foliar (por duplicado), de la hoja inoculada y hojas distales. El material así obtenido fue machacado en 500µl de agua, se centrifugó la suspensión así obtenida, y se cuantificó la radioactividad presente en el sobrenadante por centelleo líquido en contador de centelleo.

2.10 Extracción de ARN.

Se efectuó la extracción de ARN a partir de 100mg de tejido de hojas superficialmente esterilizadas, congelado en nitrógeno líquido inmediatamente a la toma de la muestra. Para la extracción se utilizó el kit: RNAeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN).

2.11 *Northern blot* y *Southern blot*.

Northern Blot:

Una vez realizada la extracción de ARN de la planta, se determinó la concentración de ARN presente en muestras calentando las mismas a 55-60 °C durante 10 min., y analizándolas en un espectrofotómetro a 260nm y a 280 nm (para obtener un índice de pureza a partir de la relación 260/280). Se utilizó como blanco agua. Se sembró 15 µg de ARN y fue sometido a una electroforesis según:

Buffer de corrida: Mops 1X (final): 40ml de Mops 10X + 360 ml de H_2O DEPC.

Gel de agarosa: 1,2%: 100ml de buffer de corrida H_2O DPC-MOPS 1X + 1.2 % agarosa con la adicion de 5 ml de Formaldehído 37%. El gel fue desarrollado por 2 horas a 65 volts.

Luego de la corrida electroforética se efectuó la transferencia por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N^+ (Amersham Pharmacia Biotech). Finalizada la misma se realizó un "*crosslinking*" con UV.

Hibridización:

Para la misma se utilizó una sonda complementaria a una porción del gen *PRI* marcada con P^{32}, la cual fue sintetizada con el sistema de "*nick traslation*" utilizando el kit: "prime-a-gene" (PROMEGA). Las membranas fueron prehibridadas (2hs a 65°C) e hibridadas durante una noche en buffer Church & Gilbert modificado.

Se efectuaron los lavados de acuerdo a los protocolos provistos por el fabricante de las membranas (GE Healthcare). Posteriormente las membranas fueron expuestas en una placa autorradiográfica Storage Phospho Screen y revelados con el scanner óptico Storm 820 (Amersham Pharmacia).

***Southern Blot*:**

Se utilizó la técnica de *Southern Blot* basándose en el siguiente protocolo:

Se cuantificó y digirió el ADN con la enzima *SacI* durante aproximadamente 16 horas a 37°C. Luego, con el objetivo de separar los fragmentos digeridos se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.2 %.

Se hicieron distintos lavados del gel que permitieron en un primer lugar depurinar al ADN, obteniendo fragmentos de menor tamaño y más fácil de transferir. Posteriormente se utilizó una solución de desnaturalización y luego se lo sometió a lavados en una solución de neutralización (la composición de las soluciones de lavado se detalla al final de este apartado).

Luego de los lavados se efectuó la transferencia por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N^+ (Amersham Pharmacia Biotech). Finalizada la misma se realizó un "*crosslinking*" con UV.

El marcado de las sondas, hibridización y revelado se realizó de la misma forma descripta anteriormente para el *Northern Blot*, salvo que las sondas utilizadas fueron fragmentos de los genes *ndvB* y *gumB* respectivamente.

Soluciones de lavado:

Solución de depurinación: HCL 0,125M.

Solución de desnaturalización: NaCl 1,5M/ NaOH 0,5M.

Solución de neutralización: NaCl 1,5M/tris-HCl 0,5M.

2.12 Análisis de deposición de callosa.

Se decoloraron las hojas en etanol 96% por 24 horas. A continuación se realizó una hidratación por etapas sucesivas de 30 minutos en las siguientes soluciones: etanol 50%, etanol 25%, buffer K_2HPO_4 87mM pH12. Posteriormente se efectuó una tinción con azul de anilina sumergiendo las hojas durante una hora en una solución 0,05% del colorante en el mismo buffer fosfato. Las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia con luz UV (200nm) en un microscopio Olympus BX60. Los ensayos se repitieron al menos tres veces. El número de deposiciones por campo se cuantificó con el software IMAGE PRO PLUS (media cybernetics).

2.13 Aislamiento, manipulación y amplificación de ADN.

1-Geles de agarosa:

Abajo se listan los protocolos generales relacionados a la corrida de ADN en geles de agarosa.

Preparación de las muestras:

2µl de loading buffer para ADN

10µl de muestra de ADN

Loading buffer:

0.025 g Bromophenol Blue

5 ml Glicerol 60%

5 ml H_2O miliQ

Tae 50x:

242 g TRIS Base

57.1 ml Acido Acético Glacial

100 ml 0.5 M EDTA pH 8

Gel agarosa (X) %:

50 ml TAE 1X (vol.final)

(X/2) gramos de agarosa

2 ul de BrEt 2ug/ml (post-disolución)

Parámetros de corrida:

tiempo: 60 minutos

voltaje: 75 V

Marcador de Peso Molecular utilizado:

Móvil 1kb ladder (0,1µg/µl) rango: 1-9,7 kb volumen: 5µl por calle

2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El proceso se llevo a cabo en un termociclador GeneAmp 9600 (PERKIN ELMER).

El protocolo genérico utilizado en todos los casos fue:

Reactivo	**Concentración stock**	**Volumen utilizado**
buffer *Taq*	10X	5µl
dNTP mix	10 mM	1µl
$MgCl_2$	25mM	3µl
Oligo 1	10 µM	1µl
Oligo 2	10 µM	1µl
Taq polimerasa	5U/µl	0.5 µl
Templado	variable	variable
H_2O	---	CSP 50µl

El programa de ciclado consistió en:

Desnaturalización inicial----------94°C, 5 minutos.

35X { Desnaturalización----------94°C, 1 minuto.
Annealing----------X°C, 1 minuto.
Extensión----------72°C, Y minutos. }

Elongación final----------72°C 10 minutos.

Las variables X e Y se ajustaron para cada amplificación particular.

3- Preparación de ADN plasmídico:

Se siguió el siguiente protocolo:

1. Crecimiento de bacterias en medio liquido durante una noche (LB).
2. Centrifugación a 13.000RPM para sedimentar todas las bacterias.
3. Descarte del sobrenadante, secado del pellet bacteriano.
4. Resuspensión del pellet en 300µl de SC I (buffer de lisis) enfriado en hielo previamente.
5. Incubación 5' a T° amb.
6. Agregado de 600µl de SC II e incubación en hielo 5'.

Preparacion de 5 ml de SC II : 1ml 1M NaOH, 0.5ml 10% SDS y 3.5 ml de H_2O deionizada.

7. Agregado de 450µl de acetato de potasio pH 4.8 (SC III) enfriado previamente.
8. Incubación en hielo 5'.
9. Centrifugación a 14.000 RPM 5'.
10. Recuperación del sobrenadante (evitando el precipitado blanco).
11. Adición de 3µl de RNAsa hasta una concentración final de 20µg/ml.
12. Incubación a 37 °C entre 15'-30'.
12. Adición 2.5 volúmenes de etanol 100%, precipitación del DNA por 15 minutos a –70 °C.
13. Centrifugación a 5.000 RPM 15'
14. Lavado del pellet con etanol 70% (enfriado previamente), secado y disolución en 30µl de H_2O estéril.

4- Preparación de ADN genómico:

Se utilizó para las extracciones de DNA cromosomal bacteriano el protocolo de CTAB/NaCl:

1. Centrifugación de 1,5ml de cultivo bacteriano a 14.000 RPM 2´
2. Resuspensión del pellet en 567µl buffer TE, 30µl SDS 10% y 3µl proteinasa K (20mg/ml). Incubación a 37°C 1h
3. Adición de 100µl NaCl 5M

4. Adición de 80µl CTAB/NaCl. Incubación a 65°C 10´
5. Adición de un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico
6. Centrifugación (4°C) a 14.000 RPM 7´
7. Remoción del sobrenadante viscoso y agregado al mismo de un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico, extracción
8. Centrifugación (4°C) a 14.000 RPM 7´
9. Transferencia del sobrenadante a un nuevo tubo y agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA
10. Spin breve a temperatura ambiente
11. Lavado del pellet con etanol 70% para remover reactivos residuales.
12. Disolución del pellet en 100µl H_2O estéril

5- Purificación de ADN a partir de geles de agarosa:

Las bandas seleccionadas se extrajeron del gel durante una breve exposición a luz ultravioleta en transiluminador, para preservar la integridad del ADN. Los fragmentos de agarosa recuperados se purificaron utilizando el kit de extracción QIAEX II (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6- Digestiones y ligaciones de moléculas de ADN:

Digestiones

Se efectuaron según protocolos del fabricante de las enzimas utilizadas (INVITROGEN, PROMEGA, NEB). En todos los casos, las enzimas se incubaron con los reactivos específicos por una hora a 37°C.

Ligaciones

Las reacciones de ligación en las cuales se utilizó el vector pGEM®-T-Easy se llevaron a cabo según las indicaciones del proveedor (Promega, EE.UU.), utilizando una relación1:5 (vector:inserto). Las demás reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 - 20 µl, conteniendo 1 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Gibco Life Technologies, Alemania), 1x de la solución de ligación comercial (5x: 250 mM Tris-HCl pH 7,6; 50 mM MgCl2; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% (p/v)

polietilenglicol-8000) y el vector e inserto en una proporción 1:3, respectivamente. Se incubaron durante 20 h a 16°C. Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α utilizando toda la mezcla como se describe en la siguiente sección.

7-Transformaciones:

Shock Térmico:

Se efectuó la transformación de células *E. coli* DH5*α* competentes (obtenidas por tratamiento con DMSO-bajas temperaturas) según el siguiente protocolo:

1. Adición de 1-5µl de DNA a alícuotas bacterianas de 200µl.
2. Incubación en hielo 30 minutos.
3. Shock térmico a 42°C 1 minuto 30 segundos.
4. Incubación en hielo 2 minutos.
5. Recuperación a 37°C 1hora en 0,8ml de medio SOC.
6. Plaqueo en medio LB sólido con los antibióticos apropiados.

Electroporación:

Células competentes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (obtenidas por tratamiento con glicerol-bajas temperaturas) fueron transformadas por electroporación según el siguiente protocolo:

1. Adición de 4µl de DNA a 40 µl de células competentes.
2. Incubación en hielo 10 minutos.
3. Electroporación en frío utilizando el equipo Gene Pulser (BIO-RAD), con los parámetros ajustados según: voltaje 2,5Kv, resistencia 200Ω.
4. Recuperación a 28°C 2h en 1ml medio Cadmus.
5. Plaqueo en medio Cadmus sólido con los antibióticos apropiados.

2.14 Mutagénesis dirigida y complementación.

Para la obtención de mutantes en los genes de interés se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida por reemplazo alélico, para lo cual se amplificaron los genes a interrumpir por PCR, se clonaron en el vector pGEM® T-easy (PROMEGA) y a éstos se

les insertó en su secuencia un *cassette* de resistencia a antibióticos (Tabla 2.2), el cual interrumpirá la expresión de estos genes.

Estas construcciones se subclonaron en un vector suicida utilizándose para transformar por electroporación las cepas silvestres de *Xcc* y *Xac* y así forzar el reemplazo del gen funcional por la copia truncada por medio de recombinaciòn homóloga, al seleccionar en placas con el antibiótico del *cassette* y sacarosa 5%.

Para seleccionar solo el evento de doble recombinación, el vector suicida posee el gen *sacB* que codifica para la enzima *levansucrasa*, que transforma la sacarosa en un producto tóxico para la célula [123]. Estos procedimientos se detallan a continuación, tanto para el gen *ndvB* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* como para el gen *gumB* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Construcción del plásmido pSAC::*ndvB*::Ω y generación de la mutante *ndvB*$^-$:

Para la construcción de este plásmido, se procedió a la amplificación de un fragmento del gen *ndvB* (XC_1468) a partir de ADN genómico de *Xcc* mediante la técnica de PCR. Para ello se utilizaron los primers *Xcc ndvB* fwd y *Xcc ndvB* rev (Tabla 2.3). Se utilizó el protocolo genérico de PCR mencionado antes, con una temperatura de "*annealing*" de 64.5º C y se dieron 1,3 minutos de extensión.

Luego de correr el producto de la reacción en un gel de agarosa 0.8%-bromuro de etidio, se extrajo en transiluminador UV la banda correspondiente al peso molecular estimado y se purificó la misma para obtener el ADN. Este producto de PCR purificado se clonó en el vector pGEM®-T easy (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se corroboró la identidad del inserto por análisis de restricción y por secuenciación. Luego se procedió a insertar en la secuencia del gen *ndvB* el *cassette Ω* para lo cual se digirió el plásmido con la enzima *SmaI* que no corta al pGEM, pero si al inserto en un sitio único ubicado en la porción media del mismo. En este sitio se insertó el *cassette Ω.* Como último paso, esta construcción se subclonó en el vector suicida pSAC [123], con la enzima de restricción *NotI*, la cual tiene dos secuencias de corte en los extremos del sitio de policlonado del pGEM, con lo cual se libera la construcción del mismo, se utilizó el mismo sitio de restricción en el plásmido receptor.

Este último paso concluye la construcción del plásmido pSAC-*ndvB-Ω* el cual fue utilizado para inactivar el gen *ndvB.*

Como paso último se transformaron células de *Xcc* por electroporación, y se las seleccionó en medio sólido Cadmus con los antibióticos espectinomicina y streptomicina de modo de seleccionar la inserción del *cassette*, el medio de selección tuvo además el agregado de sacarosa 5% para eliminar aquellos clones en los cuales hubo un evento de recombinación simple, y se halla integrado el plásmido al genoma de *Xcc*, quedándonos solo con los clones que han sufrido el evento de doble recombinación, donde el gen blanco ha sido inactivado.

Construcción del plásmido pBBR1::*ndvB*:

Esta construcción se ha utilizado para complementar la cepa mutante *ndvB*$^-$. Para el armado de la misma se amplificó por PCR la región codificante del gen *ndvB* más una porción de 300 pb río arriba del gen para asegurar incluir en la construcción el promotor propio del gen *ndvB*. Para ésto se utilizaron los primers *Xcc* C-*ndvB* fwd. y *Xcc* C-*ndvb* rev. listados en la Tabla 2.3. A continuación se clonó el fragmento amplificado en el plásmido pGEM®-T easy (PROMEGA). Se comprobó la identidad del inserto y la ausencia de mutaciones por secuenciación. Luego, se escindió el fragmento clonado con la enzima de restricción EcoRI y se subclonó en el vector pBBR1-MCS2 (Tabla 2.2). Esta construcción fue utilizada para transformar por electroporación la cepa *ndvB*$^-$ y complementarla.

Construcción del plásmido pSAC::*gumB*::Kn^R y generación de la mutante *gumB*$^-$:

Para la generación de esta construcción se amplifico por PCR un fragmento de de la región codificante de los genes *gumB-C* (una pequeña porción del gen *gumC* fue amplificada, pero el cassette fue insertado en la secuencia del gen *gumB* por lo que consideramos que el gen *gumC* no fue afectado directamente) utilizando el juego de primers *Xac gumB* fwd y *Xac gumB* rev (Tabla 2.3) diseñados a partir de la secuencia disponible en la base de datos del NCBI (XAC2585). Se purificó el producto de PCR obtenido y se clonó en el vector pGEM®-Teasy (Promega). El fragmento *gumB-C* clonado dentro del pGEM fue abierto con la enzima *Bam*HI. En ese sitio se insertó un fragmento de 2-kb que contiene un cassette Kn^R del plásmido pAZ. Luego, esta

construcción fue digerida con *Not*I para liberar el fragmento *gumB-C*::Kn^R y subclonarlo en el vector suicida pSAC que porta el gen *sacB*, generándose el plasmido pSAC::*gumB*::Kn^R (Tabla 2.2).

Como paso último se transformaron células de *Xac* por electroporación y se las seleccionó en medio sólido Cadmus con el antibiótico kanamicina de modo de seleccionar la inserción del *cassette*, el medio de selección tuvo además el agregado de sacarosa 5% para eliminar aquellos clones en los cuales hubo un evento de recombinación simple, y se halla integrado el plásmido al genoma de *Xcc*, quedándonos solo con los clones que han sufrido el evento de doble recombinación, donde el gen blanco ha sido inactivado.

2.15 Cromatografías.

1-Filtración por geles:

Se utilizó la matriz Bio-Gel P-4, fine (BIORAD) en columna de 50 x 1 cm equilibrada con ácido acético 5%. Los volúmenes de exclusión total y de inclusión se determinaron por los volúmenes de elusión del dextrano azul (4 mg) y de $CoCl_2$ (200 µmoles), respectivamente. El flujo de la columna se reguló en 0,25 ml/min y se colectaron fracciones de 0,5 ml. La detección de los hidratos de carbono no radioactivos se realizó por el método de antrona-sulfúrico. En los casos donde se utilizó material radiactivo, se midió radioactividad en las fracciones colectadas por centelleo líquido.

2-Cromatografía en capa delgada:

Se utilizaron placas de Silica Gel 60 (MERCK), las cuales fueron sembradas y desarrolladas dos veces, en la mezcla de solventes butanol/etanol/agua (5:5:4) y reveladas con ácido sulfurico 5% en etanol y calor (120°C) durante 10 minutos.

2.16 Cuantificación de hidratos de carbono.

Se determinó la cantidad de hidratos de carbono mediante el método de antrona- sulfúrico, que a continuación se describe brevemente:

1. 200µl muestra + 1ml reactivo (sc. de 600mg antrona en 300ml de H_2SO_4 puro).
2. incubación a 90°C 10 minutos.

3. lectura de absorbancia a 630nm.

2.17 Extracción de glucanos periplasmáticos.

Para cromatografía de filtración por geles, los glucanos celulares se extrajeron utilizando àcido tricloroacético 10% como ya ha sido descripto [76]. Brevemente: las bacterias cultivadas en 200 ml de cultivo fueron cosechados por centrifugación (10.000 RPM, 15 minutos). Los pellets se resuspendieron en ácido tricloroacético 10% en 1% del volumen original del cultivo, y se extrajeron los glucanos durante 1 hora, a temperatura ambiente. Luego de centrifugar nuevamente (10.000 RPM, 15 minutos), el sobrenadante es liofilizado y resuspendido en agua para su posterior cromatografía en la columna Bio-Gel P-4. El material eluído correspondiente al glucano cíclico β-(1,2) fue recolectado y liofilizado.

Para cromatografía en capa delgada, las bacterias de 3 ml de cultivo de una noche, fueron cosechadas por centrifugación y se extrajeron los polisacáridos con 300 µl de etanol 70 %, a 37°C, por una hora. Los sobrenadantes de esta extracción fueron concentrados a sequedad en vacío, y resuspendidos en 10 µl de etanol 70%, para ser sembrados en las placas.

2.18 Síntesis "*in vitro*" de glucanos β-(1,2) cíclicos.

Para la síntesis in vitro de ^{14}C-glucanos se utilizarán membranas totales de *Xcc* en incubaciones en presencia de UDP-[^{14}C-Glc] como ha sido descripto [132]. Los ^{14}C-glucanos así obtenidos fueron separados del precursor marcado por medio de columnas de filtración molecular Bio-Gel P-4. Los ^{14}C-glucanos preparados por este método tienen una A.E: 325µC/µmol.

2.19 Purificación de polisacáridos extracelulares.

Se efectuó la extracción del xantano de las cepas silvestres y de las mutantes como parte del proceso de caracterización de las mismas. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Centrifugación de cultivos bacterianos líquidos de 5-7 días, 2 minutos a 5.000 RPM.
2. Obtención de un sobrenadante libre de células y agregado al mismo de 1% KCl.

3. Precipitación del polisacárido con 2 volúmenes de etanol 96%.
4. Centrifugación 20 minutos a 5.000 RPM.
5. Resuspensión en agua hasta disolución total.
6. Liofilización del pellet conteniendo el exopolisacárido.
7. Estimación del peso del liofilizado refiriéndolo a la masa celular húmeda.

2.20 Estudios de adherencia bacteriana.

In vitro:

Esta técnica se basa en el ensayo colorimétrico en microplaca que involucra la tinción con cristal violeta ya descripta [133]. Se crecieron células de *Xac* en medio Cadmus con agitación a 28°C durante toda la noche. Se tomó una alícuota y se diluyó 1000 veces en medio mínimo, y se crecieron a la misma temperatura hasta una DO_{600} de 0,1. De dicho cultivo se tomaron alícuotas de 100 µl y se sembraron en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos de poliestireno con base plana (Corning Incorporated, EE.UU). Se incubaron sin agitación a 28°C hasta el momento de su utilización. Finalizado este tiempo, el medio fue removido suavemente usando una micropipeta automática. Se lavaron los pocillos tres veces con 150 µl de H_2O destilada estéril y se incubó la placa a 60°C por 20 min. Las bacterias adheridas a la superficie de la placa se revelaron con 150 µl de una solución de cristal violeta 30% (p/v).

Se dejó actuar el colorante a temperatura ambiente durante 45 min. Posteriormente, cada uno de los pocillos se lavó suavemente tres veces con 150 µl de H_2O destilada estéril para remover el colorante que no fue adherido a las bacterias. Finalmente, se resuspendió el cristal violeta incorporado por las bacterias en 100 µl de una solución acetona-etanol (20% acetona) y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas (PowerWave XS, Bio-Tek). En este trabajo se promedió la lectura de 36 experimentos independientes.

In vivo:

En el laboratorio desarrollamos un método sencillo para evaluar la adhesión bacteriana en hojas de *Citrus limon*. Para ello, se crecieron las cepas de *Xac* en las mismas condiciones descritas anteriormente para el ensayo *in vitro*. Además, se

cortaron discos de hojas de limonero de aproximadamente 35 mm^2 y se montaron en cajas de petri, con la cara adaxial hacia abajo. Inmediatamente, se agregó sobre los discos de hojas 3 ml del cultivo bacteriano a una concentración de $1x10^6$ ufc/ml. Se incubó sin agitación a 28°C durante 1, 3, 15 y 24 h. Cumplido el tiempo de incubación, los discos de hojas fueron lavados tres veces con H_2O destilada estéril. Finalmente, se determinó la proporción de bacterias adheridas a la epidermis utilizando 3 ml de una solución de cristal violeta 30% (p/v). Se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Los discos se lavaron tres veces con H_2O destilada estéril para remover el exceso de colorante. Se analizó macroscópicamente el colorante adherido a las células bacterianas que, a su vez, están unidas a la superficie de la hoja. La intensidad del color azul es directamente proporcional al número de bacterias adheridas.

2.21 Microscopía Confocal del biofilm.

Se utilizaron para los estudios de biofilms, tanto *in vitro* como *in vivo*, cepas de *Xac* transformadas por electroporación con el plásmido pMP2444 (Tabla 2.3) que posee el gen que codifica para la proteína verde fluorescente [126]. Así como también, un microscopio láser confocal de barrido invertido (CLSM) (Carl Zeiss LSM510-Axiovert 100M).

Estudio *in vitro*:

Este ensayo se llevó a cabo en cámaras con fondos de vidrio de borosilicato de 1 µm de grosor (Lab-TekTM Nunc; No. 155411), como fue descripto anteriormente [100]. Para ello, las cepas de *Xac* que expresan GFP se crecieron en medio mínimo conteniendo 1% de glucosa y el apropiado antibiótico a 28°C durante toda la noche con agitación. Posteriormente, se tomó una alícuota y se diluyó 1000 veces en medio fresco, se incubó el cultivo en las cámaras con fondo de vidrio a 28°C durante 7 días, sin agitación. La incubación fue realizada dentro de cajas de petri estériles humedecidas para evitar la desecación. Finalmente, se examinó el crecimiento bacteriano por CLSM y se utilizó el software Zeiss LSM Image Browser Version 3.2.0 para generar las secciones e imágenes tridimensionales.

Estudio *in vivo*:

En este caso, se inoculó con cepas de *Xac* que expresan la proteína GFP hojas de limonero por el método de aspersión. Se recubrieron las plantas infectadas con bolsas de nylon humedecidas, y se colocaron en un invernadero con un rango de temperatura de 25-30°C, hasta la aparición de cancros. Se escindieron fragmentos foliares de aproximadamente 1 cm^2 y luego, se montaron sobre porta objetos con la cara abaxial hacia abajo. De la misma manera descrita en el ensayo *in vitro*, la población bacteriana crecida sobre la epidermis se examinó con un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss LSM510-Axiovert 100M). También, se utilizó el software Zeiss LSM Image Browser Version 3.2.0 para generar las imágenes.

2.22 Diseño de cebadores para *Loop Mediated Isothermal Amplification*.

Para la amplificación por *loop mediated isothermal amplification* (LAMP), se diseñaron cebadores específicos de acuerdo a las secuencias del gen *pthA* de *Xanthomonas citri subsp. citri y* los homólogos de *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* tipo B y C utilizando el programa Primer Explorer versión 4 (Net Lab, Tokio, Japón). Los cebadores seleccionados se listan en la Tabla 2.3.

2.23 Condiciones de reacción para *Loop Mediated Isothermal Amplification*.

La reacción de LAMP se llevó a cabo en un baño térmico seco con un soporte para tubos de 0.5ml. Las condiciones estándar de reacción fueron:
40 pmol de cada uno de cebadores CBC-FIP y CBC-BIP, 5 pmol de cada uno de los cebadores externos CBC-F3 y CBC-B3, 20 pmol de cada uno de los cebadores CBC-LF y CBC-LB, 8 U de BST ADN polimerasa, 4.5 mM $MgSO_4$, 1.4 mM de la mezcla de dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Triton X-100 y 1,6 M de betaína, en un volumen final de 25 µl. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 30 minutos.

2.24 Análisis de productos de amplificación de *Loop Mediated Isothermal Amplification*.

Electroforesis en gel:

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis a 100 V durante 50 minutos en un gel de agarosa al 1,5%, seguido de revelado por bromuro de etidio.

Tiras tipo test de embarazo (*lateral flow dipstick*):

El análisis directo de los productos de LAMP fue llevado a cabo utilizando tiras genéricas de lateral flow dipstick (LFD) (BEST type I cassette™, Biohelix Co, Beverly, MA, EE.UU). Estas tiras son capaces de detectar un amplicón que está doblemente marcado con biotina y fluoresceína. Para este propósito se utilizaron cebadores CBC-FIP etiquetados en el extremo 5' con biotina y cebadores CBC-BIP marcados en el extremo 5' con fluoresceína en las reacciones de amplificación. Después de la amplificación, el tubo de reacción es insertado en la cámara de detección, el amplicón doblemente marcado se mezcla automáticamente con el buffer de detección, y la mezcla comienza a ser dirigida por flujo capilar hacia la tira.

El producto de amplificación se detecta en la zona de prueba (T) de la tira mientras que la zona de control (C) sirve como un control para la función de flujo del dispositivo. El proceso de detección se completa en unos 10 minutos.

Coloración por SYBRGreen®:

La inspección para la amplificación se llevó a cabo también través de la observación del cambio de color tras la adición de 1 µl de una dilución 1:1000 del colorante SYBRGreen® al tubo de reacción. En el caso de la amplificación positiva el color naranja original del colorante vira a un color verde que se puede visualizar a la luz del día.

2.25 Estudios de Sensibilidad del ensayo.

Para evaluar la sensibilidad del ensayo a partir de ADN puro, 100 ng de ADN de *Xac* furon diluidos 10 veces y se utilizó como templado para las amplificaciones.

Para la prueba de sensibilidad a partir de células cultivadas, se prepararon diluciones seriadas al décimo de cultivos líquidos de *Xac*. Alícuotas de 4 µl de esas diluciones se utilizaron como templados para la amplificación, y para plaqueo a fin de determinar la cantidad de UFC que se encontraban en cada alícuota.

En el ensayo de sensibilidad a partir de tejidos infectados, hojas de cítricos infectados artificialmente se maceraron y se utilizaron como material de partida para el mismo procedimiento mencionado arriba.

2.26 Preparación de ADN para los ensayos de *Loop Mediated Isothermal Amplification*.

Para los ensayos de sensibilidad desde ADN puro de *Xanthomonas* y para los ensayos de especificidad utilizando ADN de distintos patógenos, se aisló ADN utilizando el kit: Wizard® Genomic DNA Purification Kit, utilizando las instrucciones provistas por el fabricante.

Para las preparaciones de ADN utilizadas en los ensayos de sensibilidad a partir de cultivos bacterianos y tejido infectado, de utilizó un método de extracción simple y rápido basado en la utilización de la resina CHELEX100 (Biorad) como ha sido descripto previamente [109].

2.27 Análisis estadístico.

Los datos sobre los que se realizó un análisis estadístico fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software,CA). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el T test de Student. Un $p<0,05$ fue adoptado para definir diferencias estadísticas significativas.

Capítulo 3:

Rol del glucano cíclico de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la interacción con su hospedador

Resumen:

Aunque los glucanos cíclicos han demostrado ser importantes en varios sistemas de interacción planta-microbio, su rol exacto dentro de estas interacciones es impreciso. En este capítulo estudiamos el rol del glucano cíclico β-(1,2) en la virulencia de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). La disrupción del gen responsable de la biosíntesis de estos compuestos generó una cepa que está comprometida en la virulencia en plantas modelo. Esta disminución en la virulencia estuvo relacionada con una activación más temprana del gen marcador de la respuesta de defensa *PR1* y con una mayor deposición de callosa.

La aplicación de glucano cíclico β-(1,2) purificado antes de la inoculación de la cepa mutante restauró su virulencia, suprimiendo la deposición de callosa y retrasando la expresión de *PR1*. Estos efectos fueron observados cuando la mutante y el glucano se aplicaron en la misma hoja, pero también cuando fueron aplicados en distintas hojas, lo que sugiere una actividad sistémica del glucano en su efecto.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo forman parte de la siguiente publicación:

Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses.

Rigano LA, Payette C, Brouillard G, Marano MR, Abramowicz L, Torres PS, Yun M, Castagnaro AP, Oirdi ME, Dufour V, Malamud F, Dow JM, Bouarab K, Vojnov AA.

Plant Cell. 2007 Jun;19(6):2077-89.

3.1 Generación y caracterización de una mutante defectiva en la biosíntesis de Glucanos cíclicos.

El análisis de secuencia del genoma de *Xcc*, publicado en el año 2002 [121] evidencia la existencia de dos genes que podrían ser responsables de la biosíntesis de glucanos cíclicos, de acuerdo a su homología con secuencias identificadas en otros sistemas bacterianos. Estos genes son el gen XCC2055 y el gen XCC4077 (identificadores génicos de GenBank), que tienen un tamaño de 8658 pb y 2397 pb respectivamente, y poseen homología con los genes *ndvB* de *Sinorhizobium* y *chvB* de *Agrobacterium.* Sin embargo, estudios previos demostraron que el primero de ellos, el gen XCC2055, no está involucrado en la biosíntesis de glucanos cíclicos en *Xcc*, ya que mutantes en las cuales se inutilizó este gen, siguen sintetizando estos compuestos [134].

Por este motivo se procedió a la interrupción del gen XCC4077, al que en adelante llamaremos *ndvB*, con la finalidad de obtener una mutante defectiva en la biosíntesis de glucanos cíclicos en *Xanthomonas*.

Mediante la utilización de la construcción plasmídica mencionada en el Capítulo 2.14, se procedió a la generación de la mutante deseada. El diagrama en la Figura 3.1 ilustra los pasos seguidos para generar la construcción utilizada.

Explicado de manera breve, un fragmento de 1,3 Kb correspondiente a una sección del gen *ndvB* y del gen lindante *ynaJ* fue amplificado por PCR. Este producto se subclonó en el vector pGEM T Easy y se insertó en la región codificante del gen *ndvB* un cassette de resistencia a espectinomicina-estreptomicina. Esta construcción se subclonó en el vector suicida pJQ200 (pSAC) dando origen al plasmido pSAC::*ndvB*::Ω. Luego de electroporar con este plasmido a la cepa silvestre 8004 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y de una adecuada selección, se generó la cepa mutante *ndvB*$^-$, que contiene una copia del gen *ndvB* interrumpido en su genoma, mientras que el gen adyacente *ynaJ* permanece inalterado. Mayor detalle sobre este procedimiento se puede encontrar en la sección 2.14 de esta Tesis.

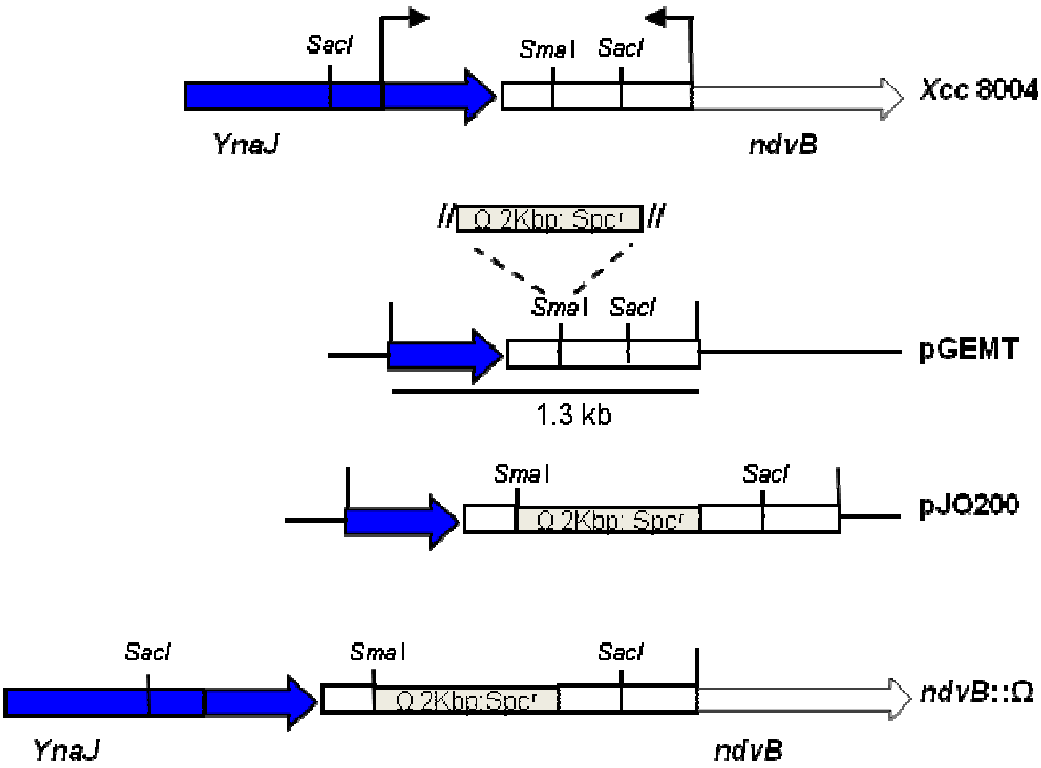


Figura 3.1: Diagrama de la construcción que se utilizó para interrumpir el gen *ndvB* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

La inserción fue corroborada por medio de *southern blot* (Figura 3.2A). En la membrana se puede observar como el gen *ndvB* aumentó de tamaño en aproximadamente 2Kb gracias a la inserción del cassette de resistencia a antibiótico.

Para evaluar si esta mutante mostraba una reducción en la síntesis de glucanos cíclicos se realizaron cromatografías en placa delgada (TLC) de extractos etanólicos bacterianos (Figura 3.2B), siendo esta una metodología ampliamente aceptada para el análisis de este tipo de compuestos [65].

La cromatografía muestra que la cepa silvestre 8004 produce un compuesto con una movilidad similar a la de un glucano cíclico purificado utilizado como estándar y además, una serie de compuestos de menor peso molecular. La flecha indica la ubicación en la que corre el patrón de glucanos cíclicos purificados, este compuesto ya ha sido caracterizado anteriormente como glucano cíclico β-(1,2) [76, 132].

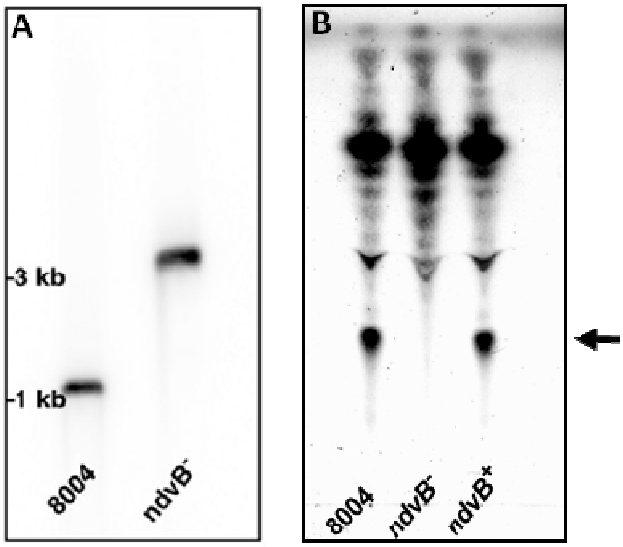


Figura 3.2: (A) *Southern Blot* de digestiones totales de ADN genómico de las cepas 8004 y *ndvB*$^-$. Como sonda se utilizó un fragmento del gen *ndvB*. (B) TLC de extractos etanólicos de células bacterianas. La flecha indica la posición donde corre un patrón de glucano cíclico purificado.

De manera interesante, la mutante en el gen *ndvB* pierde totalmente la capacidad de producir este glucano cíclico. Para terminar de corroborar que la inserción en el gen *ndvB* es la responsable de este fenotipo, la mutante complementada con un plásmido que porta el gen que fue interrumpido es restaurada en la producción de glucanos cíclicos. De esta manera confirmamos que la mutante en el gen *ndvB* no produce glucanos cíclicos β-(1,2).

3.2 Caracterización de la interacción entre la cepa *ndvB*$^-$ y la planta.

Inoculación de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* con las cepas 8004 y *ndvB*$^-$ de *Xcc*.

Se evaluó la capacidad infectiva de las cepas silvestre 8004 y mutante *ndvB*$^-$ en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron estas plantas como hospedadores en nuestros experimentos ya que son plantas modelo ampliamente utilizadas y aceptadas por la comunidad científica y se conoce mucho acerca de su fisiología.

Para hacer esta evaluación se inocularon por infiltración las cepas 8004, *ndvB*$^-$ *y ndvB*$^+$ en hojas de *N. benthamiana* utilizando un inoculo de 10^7 UFC/ml. Para la

inoculación de *A. thaliana* se utilizó el método de *dipping* explicado en la Sección 2.9 con las mismas concentraciones de inoculo bacteriano.

En el caso de *N. benthamiana*, luego de cinco días post-inoculación se apreciaron claros síntomas de enfermedad en la plantas inoculadas con la cepa silvestre 8004, mientras que en la planta inoculada con la cepa mutante *ndvB* $^{-}$, sólo se evidenció una leve clorosis (Figura 3.3). La cepa complementada *ndvB*$^{+}$ recuperó su fenotipo infectivo.

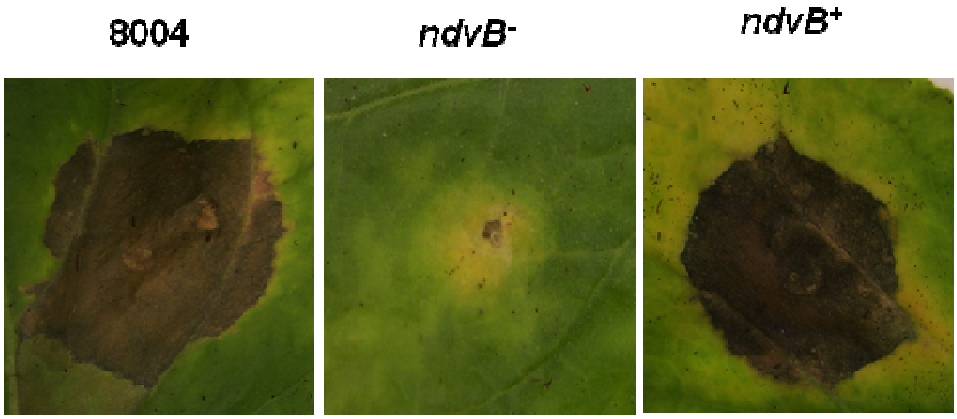


Figura 3.3: Infección de *Nicotiana benthamiana* por las cepas 8004, *ndvB* $^{-}$ *y ndvB*$^{+}$ de *Xcc.* Síntomas luego de 5 días post-inoculación.

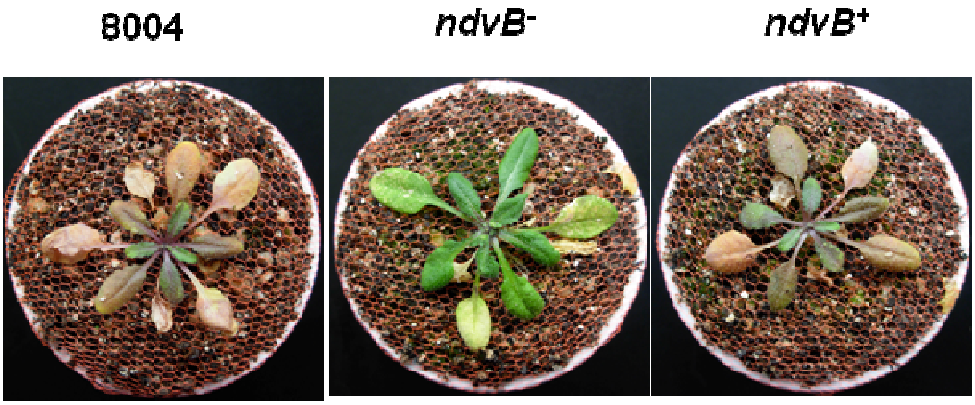


Figura 3.4: Infección de *Arabidopsis thaliana* por las cepas 8004, *ndvB* $^{-}$ *y ndvB*$^{+}$ de *Xcc.* Síntomas luego de 6 días post-inoculación.

En las plantas de *A. thaliana*, luego de 6 días post-inoculación se pudo apreciar de modo similar que en *N. benthamiana* que la cepa silvestre causó síntomas claros de enfermedad (Figura 3.4), mientras que la mutante defectiva en la biosíntesis de glucanos cíclicos β-(1,2) se mostró muy reducida en su capacidad de generar síntomas

de enfermedad en la planta. Nuevamente la mutante complementada recuperó la capacidad infectiva.

Paralelamente, se realizaron curvas de crecimiento de estas cepas "*in-planta*", utilizando ambas plantas modelo (Figura 3.5).

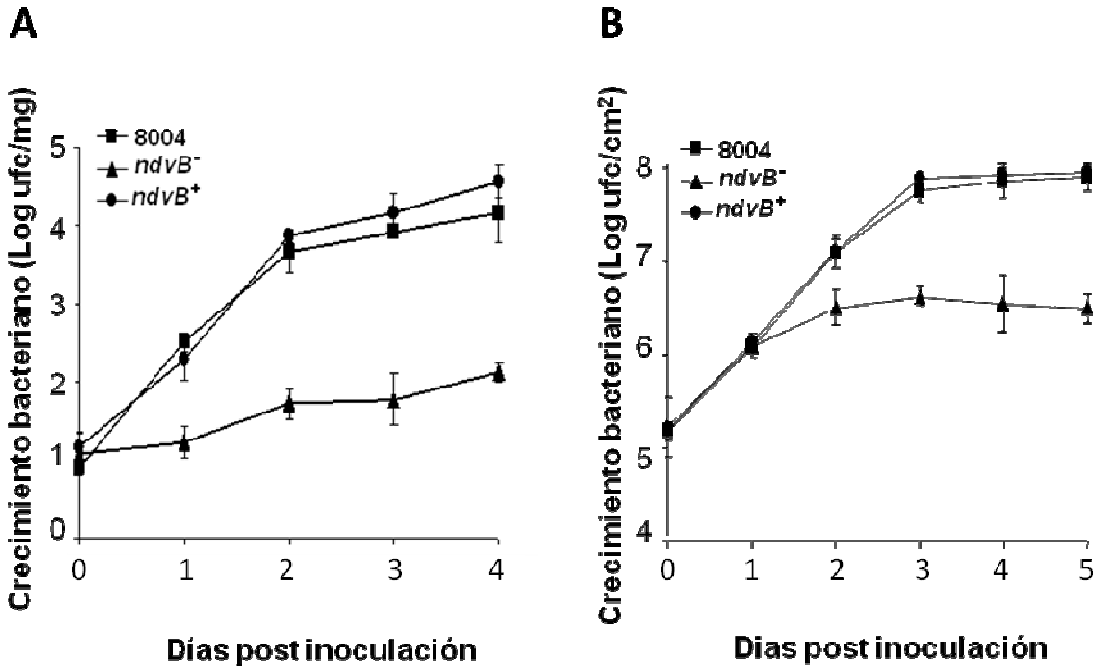


Figura 3.5: Infección de y *Arabidopsis thaliana* (A) y *Nicotiana benthamiana* (B) por las cepas 8004, *ndvB⁻ y ndvB⁺* de *Xcc.* Se muestran las curvas de crecimiento de las cepas *in planta* en el tiempo.

Las curvas de crecimiento mostraron que la cepa silvestre 8004 incrementó su población significativamente más rápido que la cepa defectiva en la síntesis de glucanos cíclicos, alcanzando niveles de crecimiento mucho mayores en ambas plantas modelo. La cepa *ndvB⁻* logró establecer una población apreciablemente menor en el mismo periodo de tiempo. Podemos apreciar una vez más que la cepa complementada recuperó las características de la cepa silvestre.

Estas diferencias en el crecimiento de las distintas cepas en la planta se corresponderían con los síntomas ocasionados por cada una de ellas.

Curva de expresión del gen *PR1* durante la interacción.

Para estudiar con más profundidad la causa de estas diferencias, se monitoreó en *N. benthamiana*, a distintos tiempos post-inoculación, la expresión del gen que

codifica para la proteína relacionada al ataque de patógeno PR1, que es utilizado ampliamente como un marcador de la activación del sistema de defensa vegetal [135].

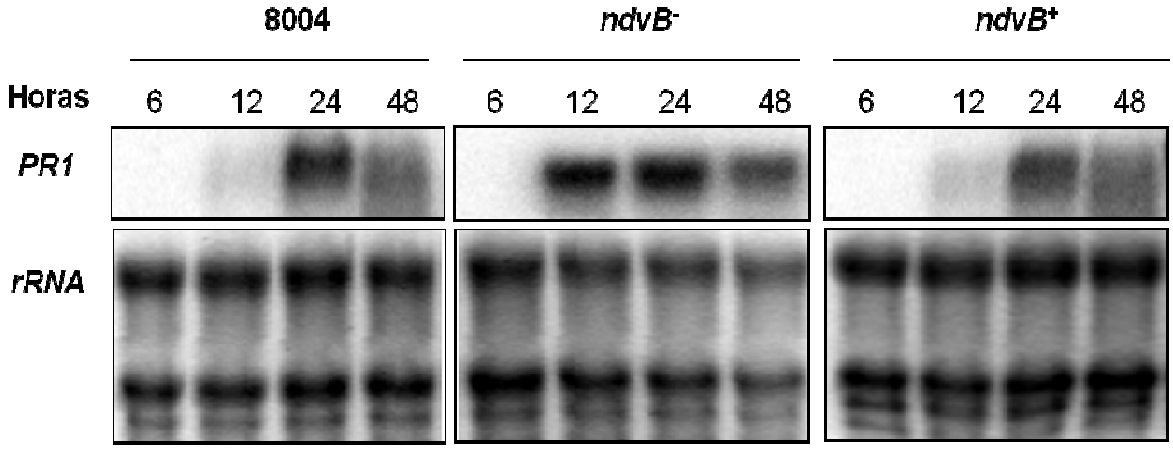


Figura 3.6: Infección de *Nicotiana benthamiana* por las cepas 8004,*ndvB* $^{-}$ *y ndvB*$^{+}$ de *Xcc.* Análisis por *northern blot* de la expresión de *PR1* a distintos tiempos post-inoculación. Se utilizó una sonda dirigida al gen *Pr1*.

En respuesta a la inoculación de la cepa 8004, la planta mostró una leve expresión del gen *PR1* a las 12 horas, dando un máximo en la expresión a las 24 horas (Figura 3.6). En contraste, en el caso de la cepa *ndvB* $^{-}$, a las 12 horas luego de la inoculación ya fue apreciable una importante expresión del gen *PR1*, la cual se mantuvo hacia las 24 horas post-inoculación. La cepa complementada indujo un patrón de expresión similar al observado con la cepa silvestre. De este experimento deducimos que la planta está respondiendo más rápida y agresivamente contra la cepa mutante *ndvB*$^{-}$.

Análisis de deposición de callosa.

La callosa es un glucano β-(1,3) con ramificaciones tipo 1,6 [136] que se localiza generalmente en granos y tubos de polen, en elementos del floema, traqueidas, plasmodesmos y pelos radiculares. Su síntesis puede ser inducida por daños mecánicos, estrés fisiológico, y por infecciones de fitopatógenos [136], como una respuesta de defensa de la planta.

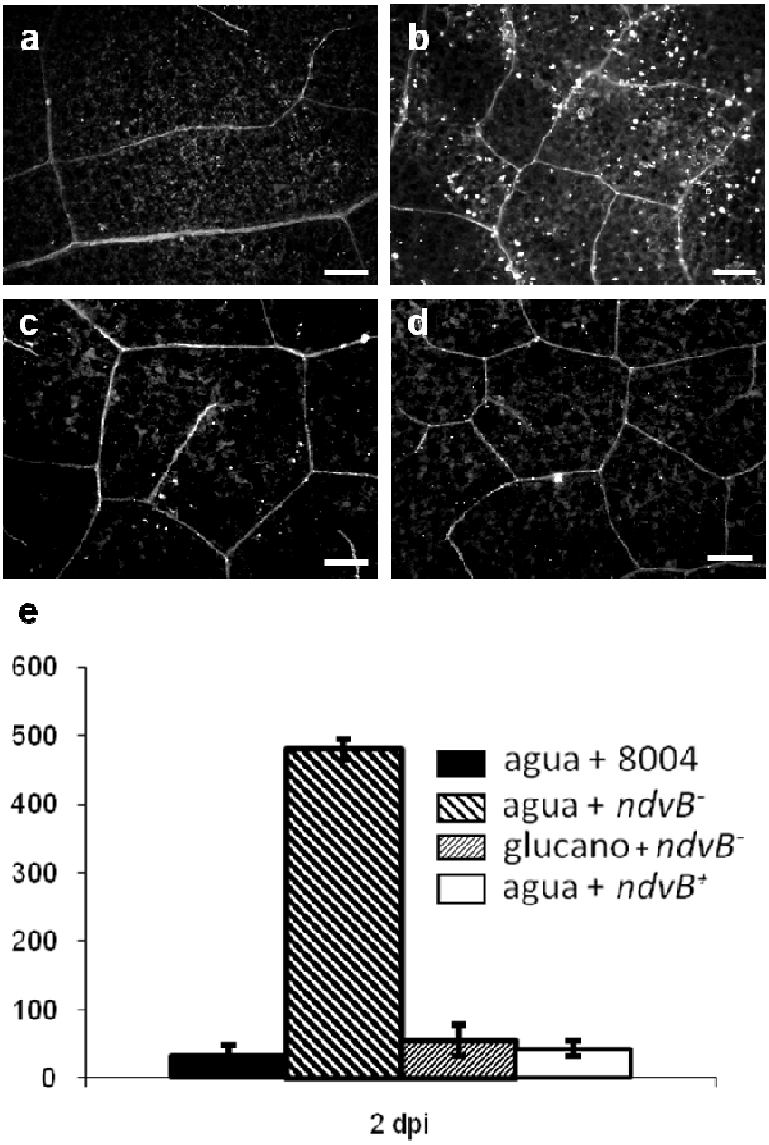


Figura 3.7: Deposición de callosa en *Nicotiana benthamiana*. Se tiñeron hojas inoculadas con las distintas cepas con azul de anilina y se observaron en fluorescencia. (a) Cepa 8004 en hoja pretratada con agua. (b) Cepa *ndvB*$^-$ en hoja pretratada con agua. (c) Cepa *ndvB*$^-$ en hoja pretratada con glucano. (d) Cepa *ndvb*$^+$ en hoja pretratada con agua. Barras de escala: 200µm. (e) número de depósitos de callosa por campo.

Por esto último, se analizó la ocurrencia de este fenómeno en plantas *de N. benthamiana* al ser inoculadas con las cepas 8004, *ndvB*$^-$ *y ndvB*$^+$ que habían sido pretratadas 24 horas antes con agua (a modo de control), o con glucano cíclico β-(1,2) purificado.

La experiencia muestra que la planta respondió ante la inoculación de la cepa *ndvB* $^-$ induciendo la deposición de callosa (la cual se aprecia como focos fluorescentes), de una manera significativamente mayor que cuando se inoculó con la cepa silvestre, (Figura 3.7 A y B). Esta respuesta de la planta fue cuantificada, contando

el número de focos fluorescentes y graficada (Figura 3.7 E) pudiéndose apreciar de manera cuantitativa este comportamiento.

Las cepa complementada, mostró una inducción de la deposición de callosa comparable a la de la cepa silvestre (Figura 3.7 D). De manera interesante, si se pretrata la hoja a la cual se va a inocular la cepa mutante con glucano purificado (50 µg/ml), se puede apreciar que la deposición de callosa se reduce significativamente (Figura 3.7 C).

La ausencia de síntomas, junto con el bajo número de bacterias que logran crecer en la planta, la rápida inducción de *PR1* y la importante deposición de callosa sugieren que la planta montó una respuesta de resistencia contra la cepa *ndvB*$^-$, la cual no ocurrió en el caso de la cepa 8004, que es capaz de colonizar la planta exitosamente, lo cual nos hace pensar que la cepa silvestre de *Xanthomonas campestris* tiene algún modo de suprimir o retrasar estas respuestas de la planta. Con estos resultados resulta evidente pensar que el glucano cíclico β-(1,2) podría ser un factor que contribuya en esta función de suprimir o retrasar la respuesta de defensa de la planta.

3.3 El glucano cíclico β-(1,2) compromete la resistencia a la enfermedad.

Pretratamientos con glucano purificado.

Para investigar un posible rol del glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* en la supresión de la defensa del hospedador, se realizaron pretratamientos con glucano purificado (50µg/ml) en hojas de *Nicotiana benthamiana* y plantas de *Arabidopsis thaliana*. Luego de 24 horas de realizados los pretratamientos se inocularon las plantas con la cepa *ndvB*$^-$ de *Xcc*.

Interesantemente, las hojas de *N. benthamiana* pretratadas con glucano cíclico β-(1,2) purificado mostraron síntomas en respuesta a la cepa *ndvB*$^-$ (Figura 3.8 B), mientras que un control pretratado con agua no desarrolló sintomatología de enfermedad alguna (Figura 3.8 A).

Para complementar estos datos se cuantificó el crecimiento de la cepa *ndvB*$^-$ tres días después de la inoculación en las hojas pretratadas con agua y en las hojas pretratadas con glucano cíclico β-(1,2) purificado. El número de bacterias recuperado

de las hojas que habían sido pretratadas con glucano fue significativamente superior al que se recuperó de hojas pretratadas con agua (Figura 3.8 C).

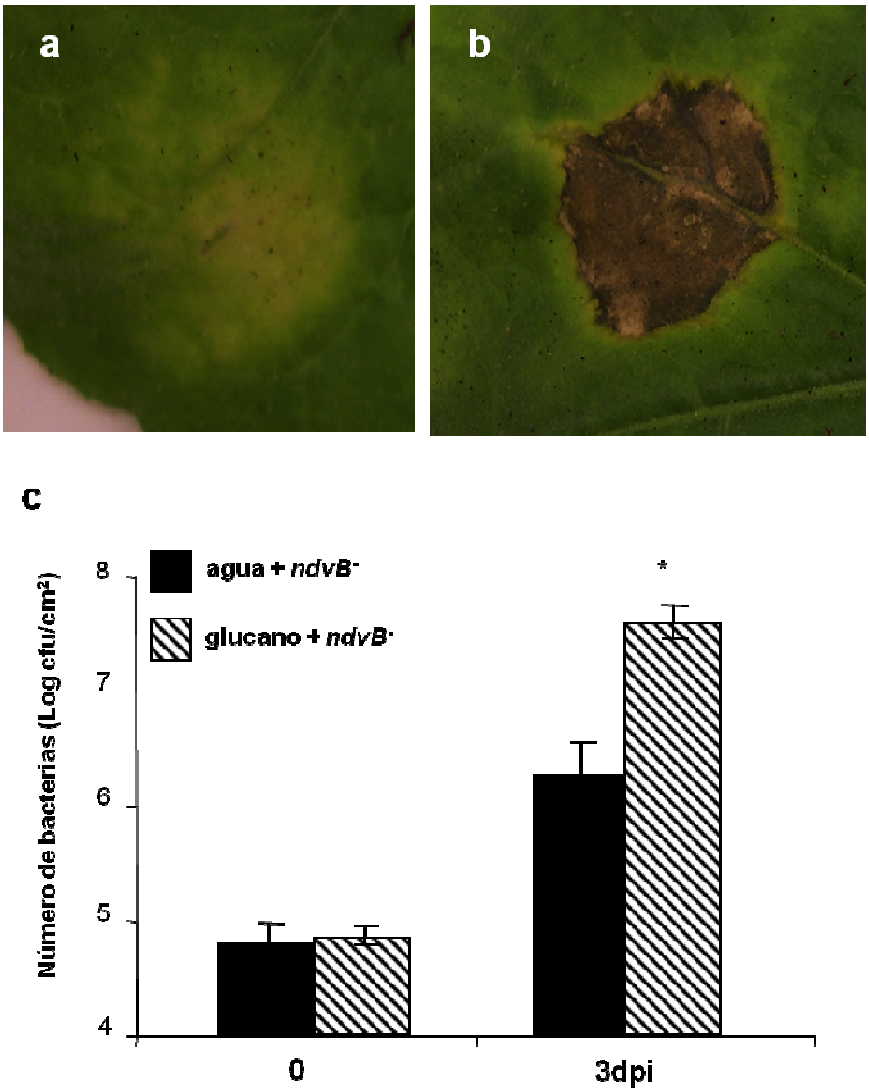


Figura 3.8: Síntomas en hojas de *Nicotiana benthamiana* pretratadas con agua (a) o glucano cíclico purificado (b) y subsecuentemente infectadas con la cepa *ndvB* $^{-}$. (c) Efecto de los distintos pretratamientos en el crecimiento de la cepa *ndvB* $^{-}$ a tiempo 0 y 3 dias post infección. Los sets de datos que están marcados con asterico son significativamente distintos del control (hojas pretratadas con agua). T Test de Student: *P<0.001.

De manera similar a lo observado en *N. benthamiana*, en el caso de *A. thaliana*, el pretratamiento con glucano purificado restableció la virulencia de la cepa mutante (Figura 3.9 A, B). Al cuantificar el crecimiento bacteriano en ambas situaciones (Figura 3.9 C), resultó significativamente superior cuando se realizó el pretratamiento con glucano purificado respecto del pretratamiento con agua.

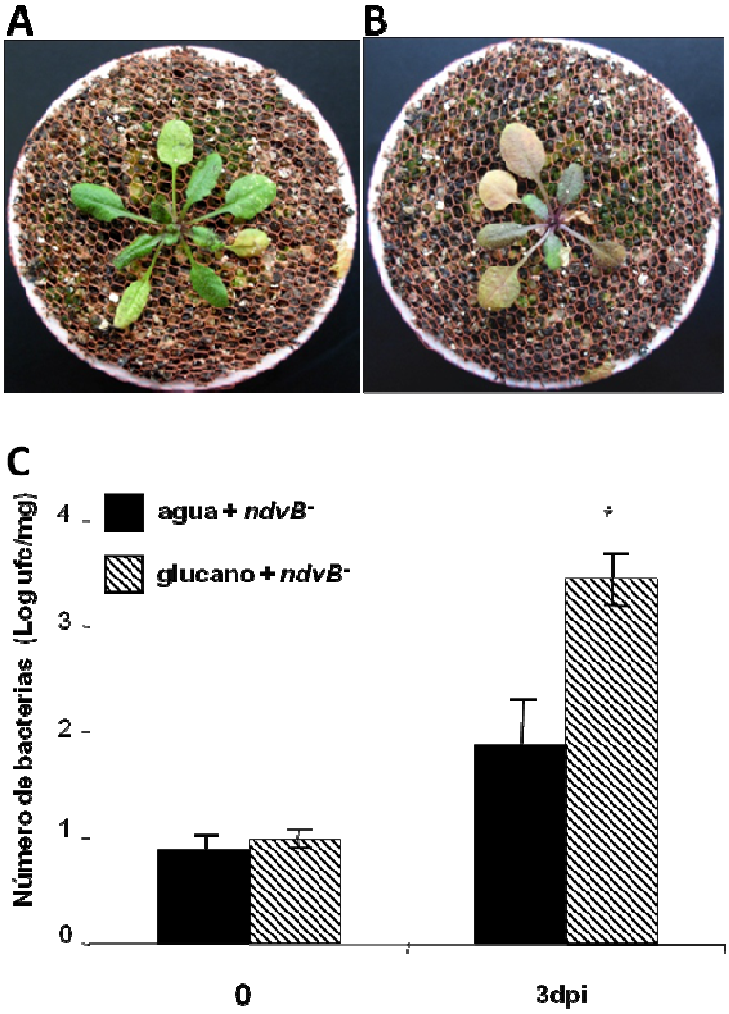


Figura 3.9: Síntomas en hojas de *Arabidopsis thaliana* pretratadas con agua (A) o glucano cíclico purificado (B) y subsecuentemente infectadas con la cepa *ndvB* ⁻. (C) Efecto de los distintos pretratamientos en el crecimiento de la cepa *ndvB* ⁻ a tiempo 0 y 3 dias post infección. Los sets de datos que están marcados con asterico son significativamente distintos del control (hojas pretratadas con agua). T Test de Student: *P<0.001.

Efecto del pretratamiento con glucano cíclico en la expresión de *PR1*.

Para estudiar si esta recuperación de la virulencia observada con el tratamiento con glucano purificado estaba asociada a una menor respuesta de defensa de la planta, procedimos a investigar si el tratamiento con este compuesto tenía efectos sobre la rápida expresión del gen de defensa *PR1* que se había observado anteriormente en el caso de la infección con la mutante *ndvB* ⁻.

Para ello se estudió la expresión de *PR1* en *N. benthamiana* por *Northern blot* a partir de ARN extraído de hojas infectadas con la cepa *ndvB* ⁻, las cuales fueron

pretratadas con glucano purificado o agua, 24 horas antes de la infección. Observamos una clara reducción en la expresión de *PR1* en las hojas infectadas con la cepa *ndvB* ⁻ que fueron pretratadas con glucano purificado, respecto a las que fueron pretratadas con agua (Figura 3.10).

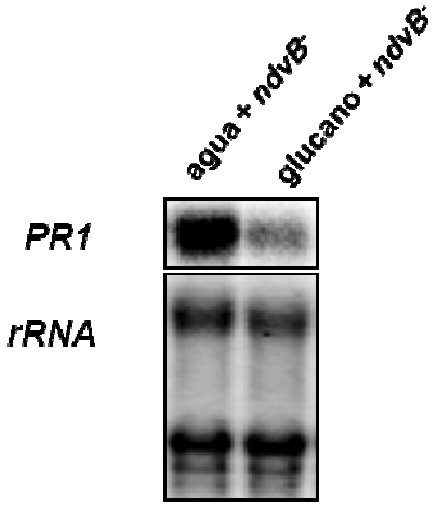


Figura 3.10: *Northern blot* mostrando el efecto de los distintos pretratamientos en la expresión del gen *PR1* ante la inoculación de la cepa *ndvB* ⁻ en *N. benthamiana*. Se utilizó una sonda para el gen *PR1*.

Estos resultados indican que el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* estaría teniendo algún efecto en la supresión o retraso de la respuesta defensiva de la planta. Concordantemente con esta idea, las hojas pretratadas con glucano cíclico β-(1,2) purificado antes de la infección con la cepa *ndvB* ⁻, no mostraron deposición de callosa, como ya se ha comentado anteriormente (Figura 3.7 C) mientras que las hojas infectadas con la cepa *ndvB*⁻ sin pretratamiento evidenciaron una alta síntesis de este compuesto (Figura 3.7 B).

El glucano aumenta la virulencia de la cepa silvestre

El pretratamiento con glucano también aumentó la susceptibilidad de *Nicotiana benthamiana* ante la propia cepa 8004, permitiendo que los síntomas aparezcan en menos tiempo y más graves (datos no mostrados). Para cuantificar esto, se analizó el crecimiento bacteriano en hojas inoculadas con la cepa 8004 que habían sido pretratadas 24 horas antes con glucano purificado, o agua.

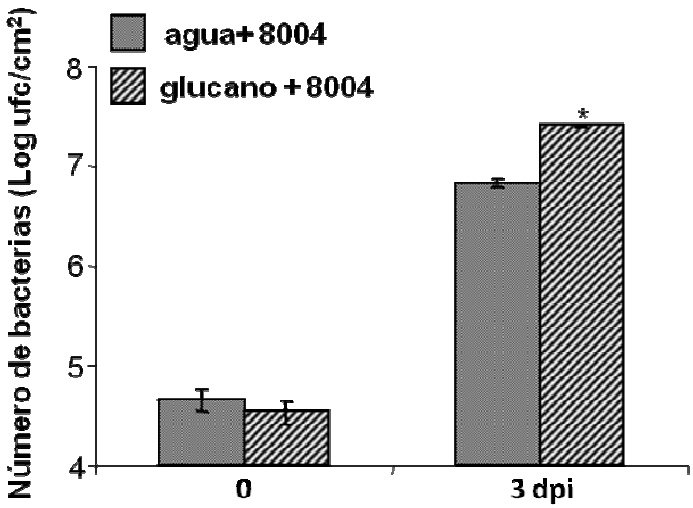


Figura 3.11: Efecto de los distintos pretratamientos en el crecimiento de la cepa 8004 a tiempo 0 y 3 dias post-infección. Los sets de datos que están marcados con asterisco son significativamente distintos del control (hojas pretratadas con agua). T Test de Student: *P<0.001.

Se encontró que el crecimiento bacteriano en hojas pretratadas con glucano cíclico purificado fue significativamente superior al crecimiento en la hoja pretratada con agua (Figura 3.11). Esto apoya la hipótesis que supone que el glucano cíclico es un supresor de la respuesta de defensa de la planta, y que al encontrarse previo a la presencia de la bacteria gracias al pretratamiento, aumenta la virulencia de la cepa silvestre ya que la bacteria estaría encontrando a un hospedador inmunosuprimido.

Estos resultados, sugieren fuertemente que el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* permite el crecimiento de la cepa *ndvB*$^-$ y el establecimiento de la enfermedad a través de la supresión local de las defensas del hospedador, que incluyen al menos la deposición de callosa, y la expresión del gen que codifica para la proteína relacionada al ataque de patógeno PR1.

Curva de dosis-respuesta.

El efecto del glucano cíclico β-(1,2) mostró ser dosis dependiente, dato que surgió de pretratar hojas de *Nicotiana benthamiana* con distintas cantidades del compuesto antes de la inoculación de la cepa *ndvB*$^-$, y cuantificar el crecimiento bacteriano tres días después de la infección. La mínima masa de glucano necesaria para establecer una supresión de la respuesta de defensa fue de 10µg (Figura 3.12).

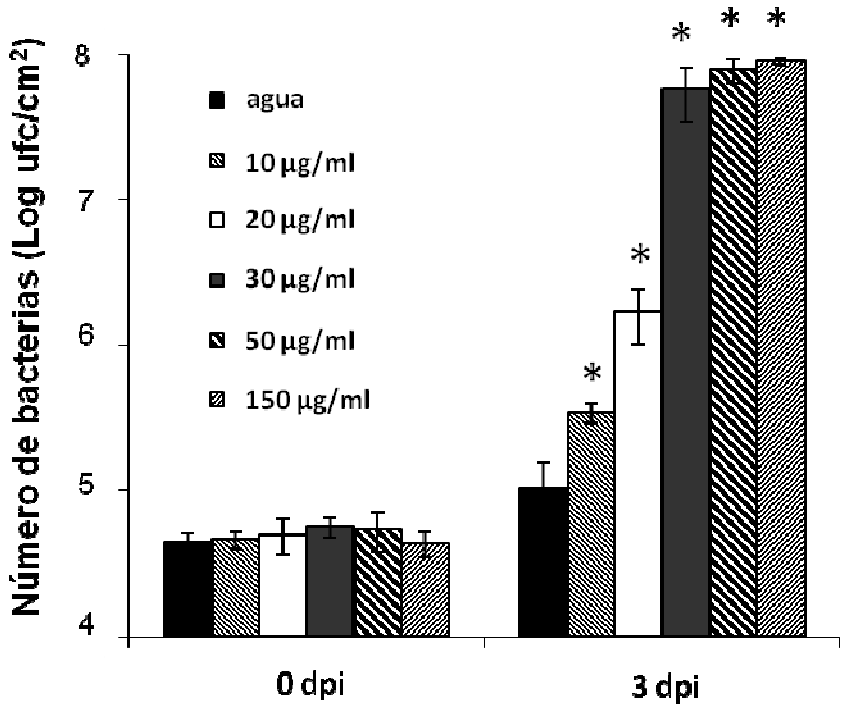


Figura 3.12: Hojas de *N. benthamiana* fueron pretratadas con distintas dosis de glucano cíclico purificado antes de la inoculación de la cepa *ndvB*⁻. Se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo cero y a tres días post inoculación. Los sets de datos que están marcados con asterisco son significativamente distintos del control (hojas pretratadas con agua). T Test de Student: *P<0.001.

Curva de Tiempo.

También analizamos si había una ventana de tiempo necesaria para la aparición del efecto supresor de la respuesta inmune del glucano. Para ello, se pretrataron hojas de *Nicotiana benthamiana* con glucano cíclico purificado, y a distintos tiempos post-pretratamiento, se les inoculó la cepa mutante *ndvB*⁻ y se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo 0 y a tiempo 3 días post-infección (Figura 3.13).

Como se puede ver en el gráfico de la Figura 3.13, el mínimo tiempo requerido para poder apreciar un efecto en la supresión de las defensas del hospedador fue de 6 horas.

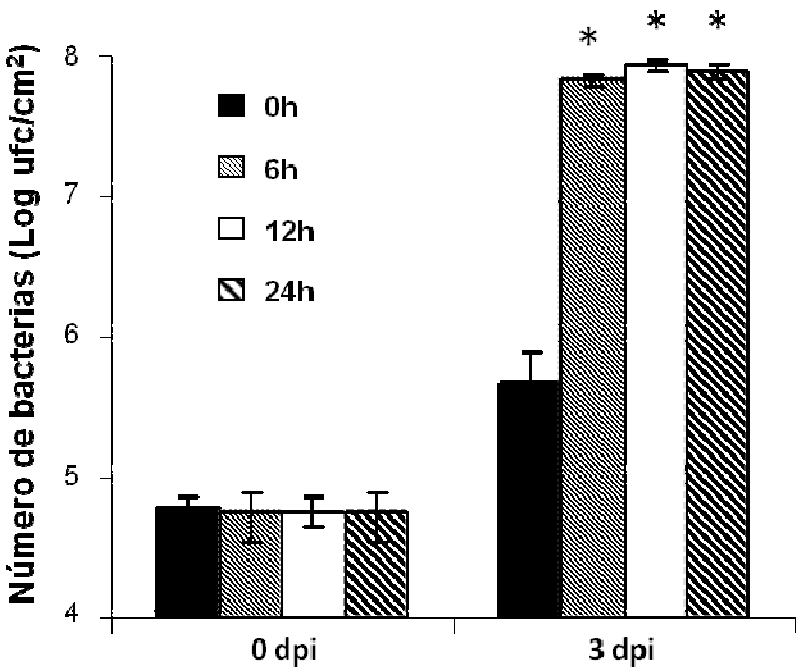


Figura 3.13: Hojas de *N. benthamiana* fueron pretratadas con glucano cíclico purificado (50 µg/ml) a distintos tiempos antes de la inoculación de la cepa *ndvB*⁻. Se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo cero y a tres días post inoculación. Los sets de datos que están marcados con asterisco son significativamente distintos del control (hojas con cero tiempo de pretratamiento). T Test de Student: *P<0.001.

3.4 El glucano cíclico β-(1,2) induce susceptibilidad sistémica a la enfermedad.

La cepa silvestre de *Xcc* induce susceptibilidad sistémica.

Los resultados que se muestran a continuación surgieron de un modo casual. En algunas oportunidades, al realizar ensayos de inoculación en *N. benthamiana* con la cepas 8004 y *ndvB*⁻, se utilizaron las mismas plantas para inocular las dos cepas (en distintas hojas), porque no se disponían plantas suficientes para realizar esas infecciones en plantas separadas. En estos casos se observó que la cepa *ndvB*⁻ generaba síntomas nuevamente si era inoculada en la misma planta en la que se había inoculado la cepa silvestre. Los síntomas eran marcadamente menores que los que producía la cepa 8004, pero aún eran mayores a los que producía la cepa mutante inoculada en una planta sin presencia de la cepa silvestre.

Sería posible que la cepa silvestre esté realizando una supresión de las defensas del hospedador en toda la planta o dicho de otra forma de una manera sistémica?

Esto explicaría por qué la cepa mutante recupera algo de su virulencia al ser inoculada en la misma planta que la cepa silvestre. Para ahondar en esta teoría, realizamos el experimento ilustrado en la Figura 3.14 A.

Para ello, se preinocularon hojas de *N. benthamiana* con la cepa 8004, y se realizó un control preinoculando con la cepa *ndvB*⁻.

Veinticuatro horas después, hojas distales a las preinoculadas, fueron inoculadas con la cepa *ndvB*⁻. Luego de tres días post-inoculación se cuantificó el crecimiento bacteriano. El tiempo de 24 horas entre la preinoculación y la inoculación de la cepa mutante tenía el objetivo de dar más tiempo para que la cepa silvestre pudiera realizar su supuesta acción supresora antes de inocular la cepa mutante.

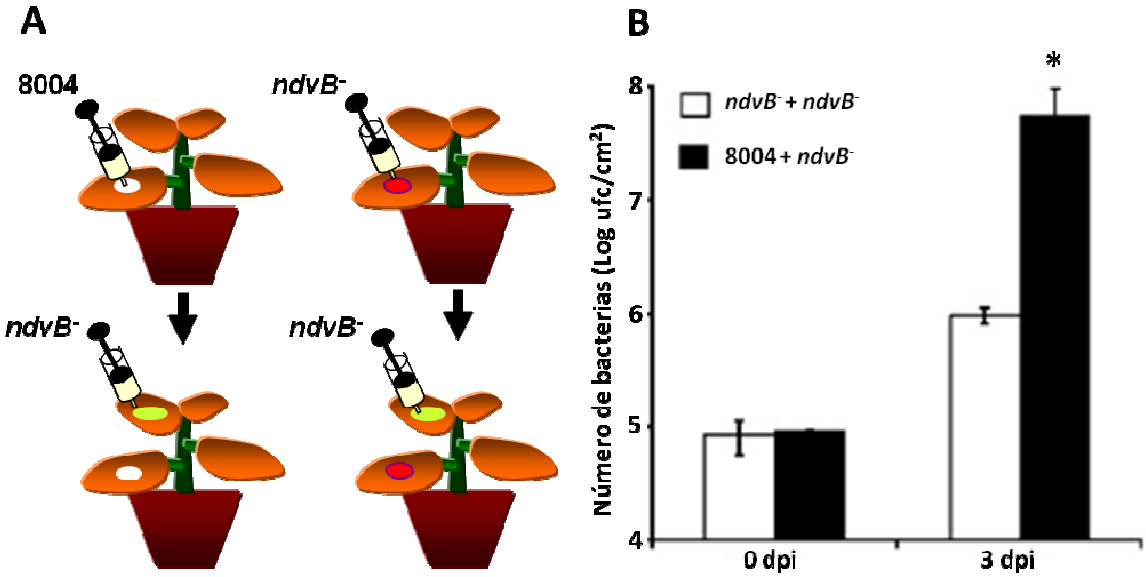


Figura 3.14: (A) Hojas de *N. benthamiana* fueron pretratadas con la cepa 8004 o la cepa *ndvB*⁻. 24 horas después hojas distales fueron inoculadas con la cepa *ndvB*⁻. (B) Se cuantificó el crecimiento de esta cepa a tiempo cero y a tres días post inoculación. Los sets de datos que están marcados con asterisco son significativamente distintos del control (plantas pretratadas con la cepa *ndvB*⁻). T Test de Student: *P<0.001.

Interesantemente, el crecimiento de la cepa *ndvB*⁻ en la planta pretratada con la cepa 8004 fue significativamente superior al de la cepa *ndvB*⁻ en la planta pretratada con ella misma (Figura 3.14 B). Esto confirmaba la hipótesis de que la cepa silvestre estaba de algún modo provocando una susceptibilidad sistémica a la enfermedad,

permitiendo que la cepa mutante, que como ya se vio anteriormente genera una respuesta de defensa exacerbada en la planta ahora se desarrolle con éxito. El glucano cíclico de Xanthomonas sería entonces necesario para este efecto, ya que, la cepa mutante *ndvB*⁻ no induce el mismo efecto.

El glucano cíclico es el responsable de la supresión sistémica.

Para confirmar que el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* tendría algún rol en estos efectos supresivos sistémicos, se pretrataron hojas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* con agua, o glucano cíclico purificado (50µg/ml). Veinticuatro horas después, las hojas preinoculadas y hojas distales a las preinoculadas, fueron inoculadas con la cepa *ndvB*⁻ (Figura 3.15).

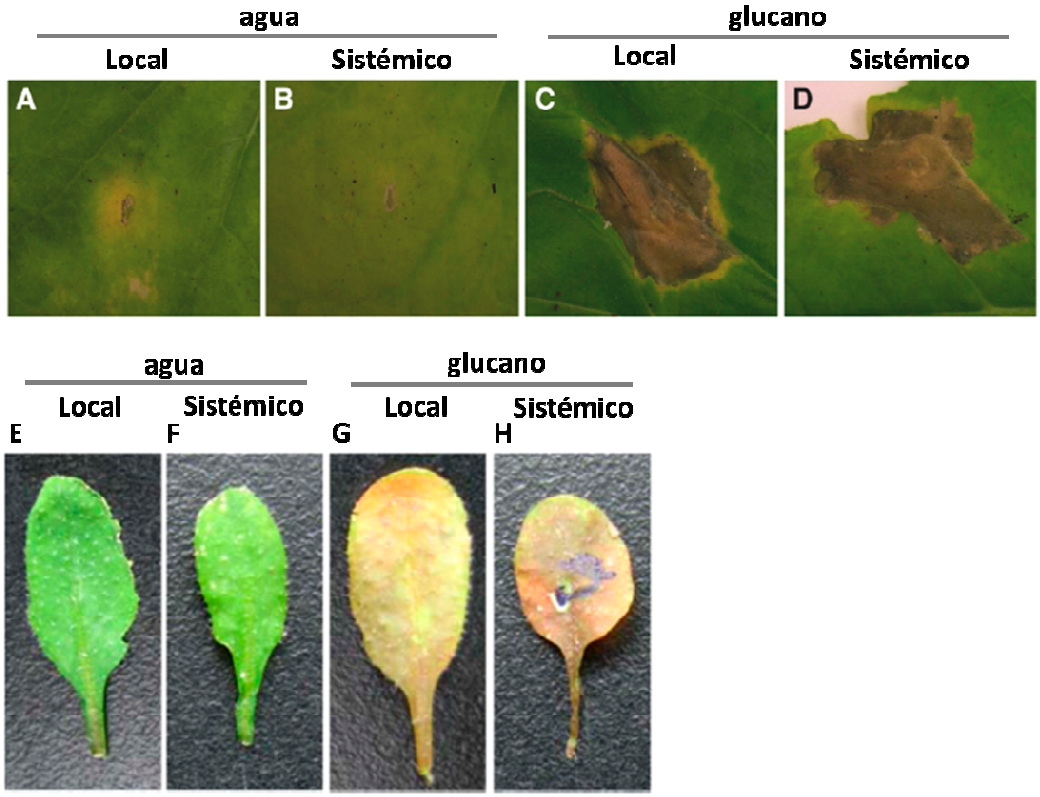


Figura 3.15: A-D, Hojas de *N. benthamiana* y A. thaliana fueron pretratadas con agua (A, E) o glucano cíclico purificado (C, G). 24 horas después se inocularon con la cepa *ndvB*⁻ las mismas hojas y hojas distales de las plantas pretratadas con agua (B, F) y glucano purificado (D, H).

Los resultados muestran que el glucano cíclico de *Xanthomonas* estaría involucrado en la generación de un estado de susceptibilidad sistémica en *N. benthamiana* y *A. thaliana*: las hojas pretratadas con glucano e infectadas con la cepa

ndvB⁻ mostraron signos de enfermedad de manera local (Figura 3.15), como ya se había observado anteriormente; sin embargo las hojas que no fueron tratadas directamente con el glucano purificado también mostraron síntomas de enfermedad ante la cepa *ndvB*⁻. Estos efectos no se observaron en las plantas pretratadas con agua.

Experimentos de *Northern blot* evidenciaron que, en las hojas de las plantas de *N. benthamiana* pretratadas con glucano purificado en el experimento anterior, la expresión de *PR1* estuvo suprimida tanto local como sistémicamente, mientras que en las plantas pretratadas con agua esto no ocurrió (Figura 3.16).

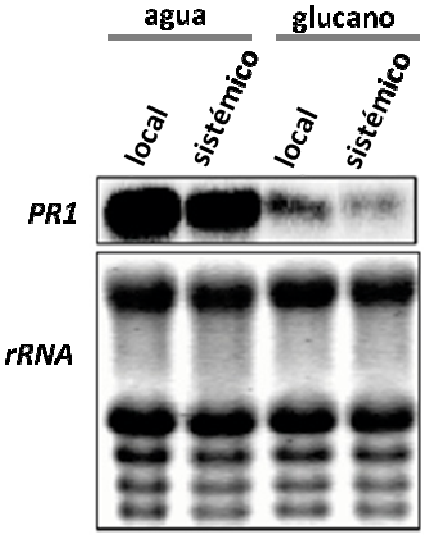


Figura 3.16: Hojas de *N. benthamiana* fueron pretratadas con agua o glucano cíclico purificado. 24 horas después se inocularon con la cepa *ndvB*⁻ las mismas hojas y hojas distales de las plantas pretratadas con agua y glucano purificado. 12 horas después se tomaron muestras de ARN y se analizaron por *Northern Blot*. Se utilizó una sonda para el gen *PR1.*

Curva de dosis-respuesta.

De la misma forma que anteriormente (Figura 3.12) se estudió cuál es la mínima dosis de glucano cíclico purificado que debía ser inoculada en la hoja para poder observar el efecto supresor local, ahora se estudió cual es la mínima dosis necesaria para poder observar el efecto sistémico. Todos estos datos servirán luego para evaluar si las cantidades de glucano utilizadas tienen una relevancia biológica en la interacción.

Para ello se pretrataron hojas de *Nicotiana benthamiana* con diferentes cantidades de glucano purificado o agua. Veinticuatro horas más tarde se infectaron

las plantas en hojas distales con la cepa *ndvB*⁻ y se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo cero y a los tres días post-infección. Se encontró que la cantidad mínima de glucano necesaria para apreciarse el efecto sistémico fue de 30µg (Figura 3.17).

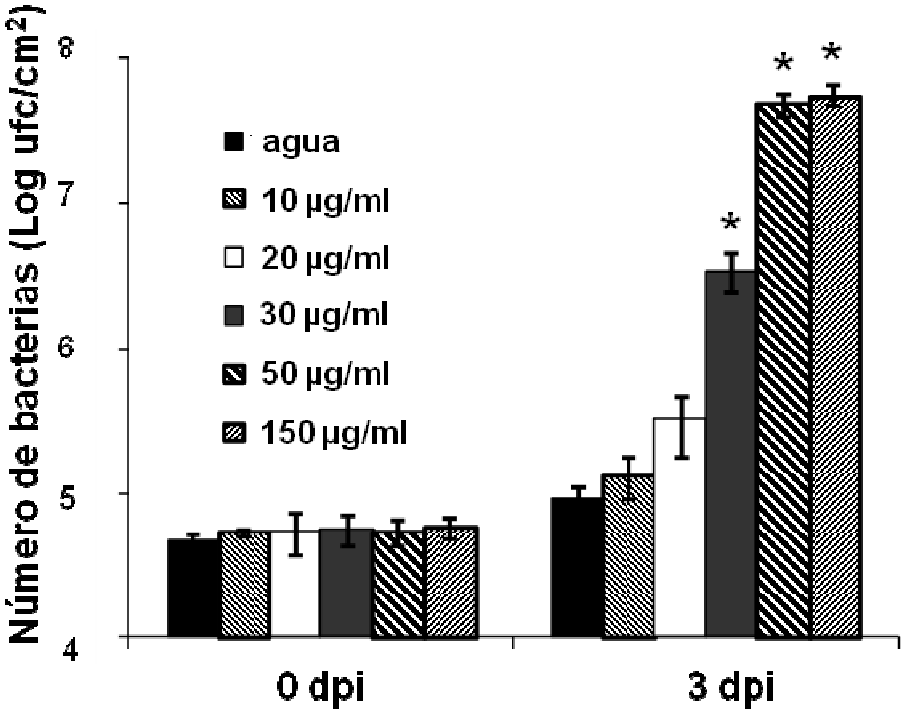


Figura 3.17: Hojas de *N. benthamiana* fueron pretratadas con glucano purificado a distintas dosis, o agua, 24 horas después, se inocularon hojas distales con la cepa *ndvB*⁻ y se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo cero y 3 días post-infección. Los sets de datos que están marcados con asterisco son significativamente distintos del control (plantas pretratadas con agua). T Test de Student: *P<0.001.

Curva de tiempo.

Se estudió cual era el tiempo mínimo necesario entre la aplicación del glucano en una hoja y la aparición del efecto de supresión sistémica. Datos sobre la cinética de este evento podrían ayudar a dilucidar cuál es el mecanismo por el cual se establece esta susceptibilidad sistémica. Para ello, se pretrataron hojas de *Nicotiana benthamiana* con glucano cíclico purificado, y a distintos tiempos post-pretratamiento, se inoculó la cepa mutante *ndvB*⁻ en hojas distales a la pretratada, luego se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo 0 y a tiempo 3 días post-infección (Figura 3.18). Se pudo determinar que el mínimo intervalo de tiempo necesario para que se establezca la susceptibilidad sistémica por el glucano cíclico fue de 12 horas.

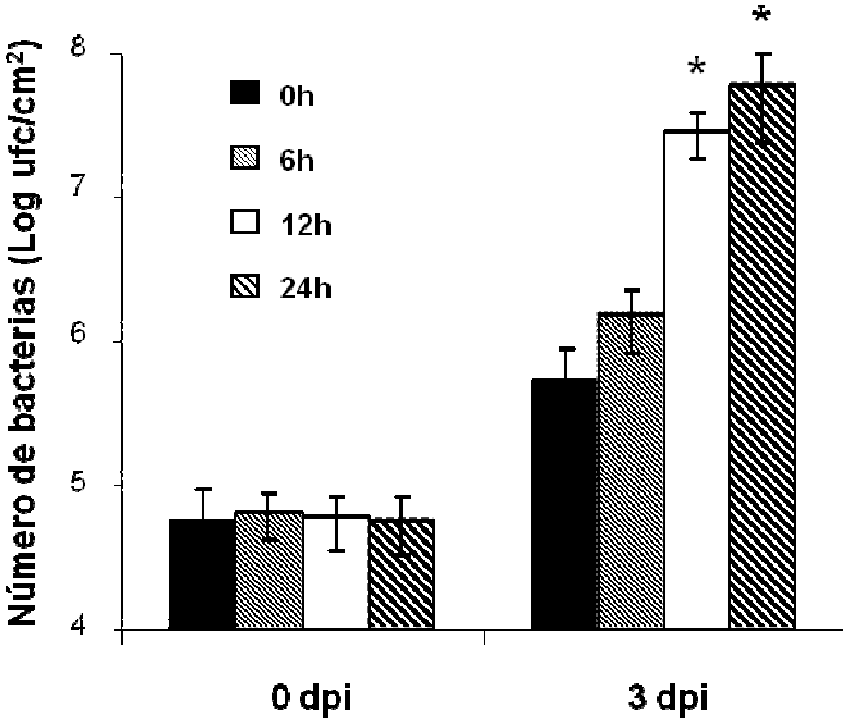


Figura 3.18: Hojas de *N. benthamiana* fueron pretratadas con glucano cíclico purificado (50 µg/ml) a distintos tiempos antes de la inoculación de la cepa *ndvB*⁻ en hojas distales a la pretratada. Se cuantificó el crecimiento bacteriano a tiempo cero y a tres días post inoculación. Los sets de datos que están marcados con asterisco son significativamente distintos del control (hojas con cero tiempo de pretratamiento). T Test de Student: *P<0.001.

El glucano se disemina sistémicamente por la planta para inducir susceptibilidad sistémica.

Al analizar la susceptibilidad sistémica inducida por el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas*, surge un interrogante: ¿Cuál es la señal que viaja a través de la planta y provoca la susceptibilidad a la enfermedad de forma sistémica? Una posibilidad es que el glucano al interactuar con la célula vegetal desencadene la producción de alguna molécula señal que se transloque por el vegetal e induzca la susceptibilidad a la enfermedad en toda la planta. Otra posibilidad es que el glucano mismo sea capaz de diseminarse a través de la planta, y que de este modo la susceptibilidad sistémica esté asociada a ésta movilidad del glucano mismo.

Para poner en prueba a esta última idea, se sintetizaron ^{14}C-glucanos por medio de una incubación de membranas totales de *Xanthomonas campestris pv. campestris* cepa 8004 con UDP-[^{14}C-Glc], se inoculó una solución de estos ^{14}C-glucanos (40.000 CPM) en una hoja de *Nicotiana benthamiana* y se monitoreó a distintos tiempos la

radioactividad por unidad de área presente tanto en la hoja inoculada como en el resto de la planta.

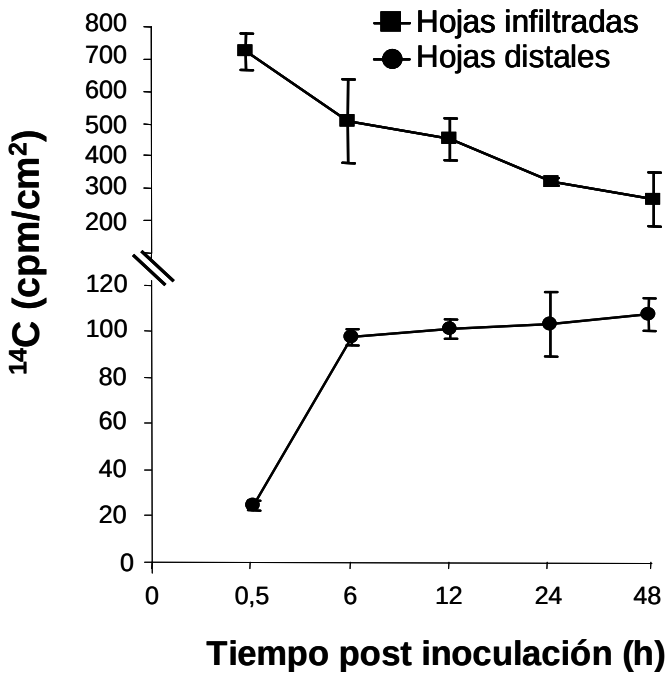


Figura 3.19: Se inocularon ^{14}C-glucanos en una hoja de *N. benthamiana*, y se monitoreó la radioactividad en las distintas hojas de la planta en el tiempo. Los datos son la media ± la SD de tres experimentos.

Como se muestra en la Figura 3.19, la radiactividad decreció con el tiempo en la hoja infiltrada, mientras que se pudo apreciar un aumento en la radiactividad registrada en hojas distales durante el transcurso del experimento.

Para descartar que la marca que se mueve en la planta corresponda a un potencial producto de degradación, y no al glucano cíclico, se sometió al material isotópico recuperado de hojas de la planta no inoculadas, a una cromatografía de filtración por geles BioGel P-4 que separa las moléculas por tamaño. El perfil de elución de este material, resultó ser el mismo que el del ^{14}C-glucano utilizado para la inoculación (Figura 3.20).

De esta forma confirmamos que el producto recuperado de la planta tiene el mismo tamaño que el inoculado, y que entonces no es ningún producto de degradación el que es detectado moviéndose dentro de la planta.

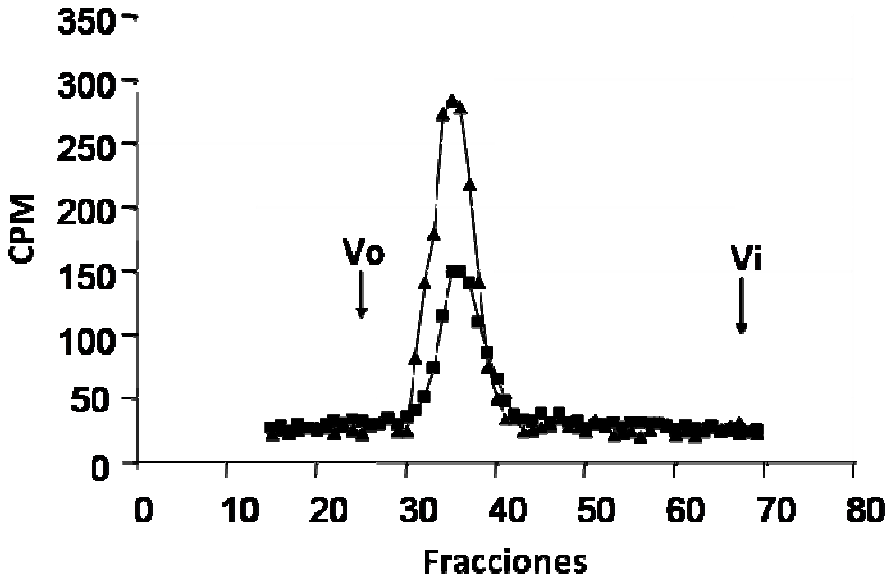


Figura 3.20: Se recuperó el material marcado de hojas distales a la inoculación y se sometió a cromatografía de filtración por geles en columna BioGel P-4 (cuadrados), comparándolo con un control representado por el mismo ^{14}C-glucano que se inoculó inicialmente (triángulos). Vo: volumen de exclusión. Vi: volumen de inclusión.

Todos estos datos sugieren que los efectos sistémicos del glucano cíclico β-(1,2) en la supresión de las defensas de la planta estarían dados por la diseminación de la propia molécula de glucano. Sin embargo no podemos excluir que la interacción entre el glucano y el hospedador genere algún otro supresor que también se mueva sistémicamente y que escape a este estudio.

Capítulo 4:

Formación de biofilms en *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: Rol en la virulencia y la supervivencia epifítica

Resumen:

La vida en comunidad ofrece a los microorganismos algunas ventajas notables. Las bacterias dentro de los biofilms son más resistentes a condiciones de crecimiento adversas, como la escasez de nutrientes y la desecación, y son más tolerantes a distintos agentes antimicrobianos.

Cuando *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) coloniza el apoplasto de hojas, tallos y frutos, induce la formación de pústulas, las cuales parecerían estar habitadas por grandes agregados de bacterias que más tarde desarrollan el síntoma maduro, o cancro. Estos agregados exhiben las características generales de los biofilms microbianos, sin embargo, hasta el momento no se ha podido establecer si estos agregados son realmente biofilms, y si este comportamiento bacteriano *multicelular* tiene relevancia en la virulencia de *Xac*.

Para responder estas preguntas se generó una cepa de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* interrumpida en el gen *gumB*, la cual es deficiente en la producción del exopolisacárido xantano. Debido a la importancia de los exopolisacáridos en la formación de biofilms, la mutante *gumB*$^-$ es incapaz de desarrollar un biofilm maduro.

Utilizando la cepa silvestre 306 y la mutante *gumB*$^-$, se evaluó el rol de la adhesión bacteriana y la formación de biofilms en la colonización del tejido foliar durante el desarrollo del cancro en hojas de *Citrus limón*. Además se analizó la función de este tipo de organización en la supervivencia epifítica de la bacteria.

Los resultados obtenidos en este capítulo forman parte de la siguiente publicación:
Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, Marano MR.

Molecular Plant Microbe Interactions. 2007 Oct;20(10):1222-30.

4.1 Generación y caracterización de una mutante defectiva en la biosíntesis de xantano.

Como se detalló en la Introducción (Sección 1.3), el xantano es el principal exopolisacárido secretado por *Xanthomonas*. Los polisacáridos extracelulares (EPS) secretados por muchas bacterias están involucrados en patogenicidad y virulencia. Recientemente, se demostró que distintas moléculas de EPS juegan un importante rol en la formación de biofilms, tanto en bacterias simbióticas como patogénicas [100, 137, 138].

A fin de investigar la formación de biofilms en *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) y el rol de este evento en la virulencia de la bacteria, se generó una mutante deficiente en la producción de xantano. Se espera que, dado el importante rol que tienen los EPS en la formación de biofilms, una mutante deficiente en la producción de xantano, sea incapaz de formar este tipo de estructuras.

La comparación genómica del *cluster* de genes *gum*, involucrado en la síntesis de xantano entre *Xac* cepa 306 y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) cepa 8004 demostró que hay un alto grado de conservación entre ambas bacterias, tanto en tamaño como en el orden génico, por lo que desde el punto de vista genético, *Xac* también sería capaz de producir xantano y que los conocimientos disponibles sobre la síntesis de xantano en *Xcc* serían extrapolables a *Xac* [121, 139]. Por otro lado hay evidencias experimentales de que *Xac* produce este exopolisacárido [140].

La proteína GumB de *Xac* (GenBank, NP-642899) comparte el 92% de identidad con la proteína GumB de *Xcc* (GenBank, YP-242744). En *Xcc* existen evidencias experimentales que demuestran que una mutación en el gen *gumB* tiene un efecto polar en la expresión de los genes *gum,* y que esta mutante es incapaz de producir xantano [141].

Por este motivo se procedió a la interrupción del gen *gumB* con la finalidad de obtener una mutante defectiva en la biosíntesis de xantano en *Xac*.

Mediante la utilización de la construcción plasmídica mencionada en el Capítulo 2.14, se procedió a la generación de la mutante deseada. El diagrama en la Figura 4.1 ilustra los pasos seguidos para generar la construcción utilizada.

Explicado brevemente, un fragmento de 1,5 Kb correspondiente a una sección del gen *gumB* y del gen lindante *gumC* fue amplificado por PCR. Este producto se subclonó en el vector pGEM ® T-Easy y se insertó en la región codificante del gen *gumB* un cassette de resistencia a kanamicina (Kn^R). Esta construcción se subclonó en el vector suicida pJQ200 (pSAC) dando origen al plásmido pSAC::*gumB*:: Kn^R. Luego de electroporar con este plásmido a la cepa silvestre 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* y de una adecuada selección, se generó la cepa mutante *gumB* $^-$, que contiene una copia del gen *gumB* interrumpido en su genoma. Mayor detalle sobre este procedimiento se puede encontrar en la sección 2.14 de esta Tesis. La inserción fue corroborada por medio de *Southern Blot* (datos no mostrados).

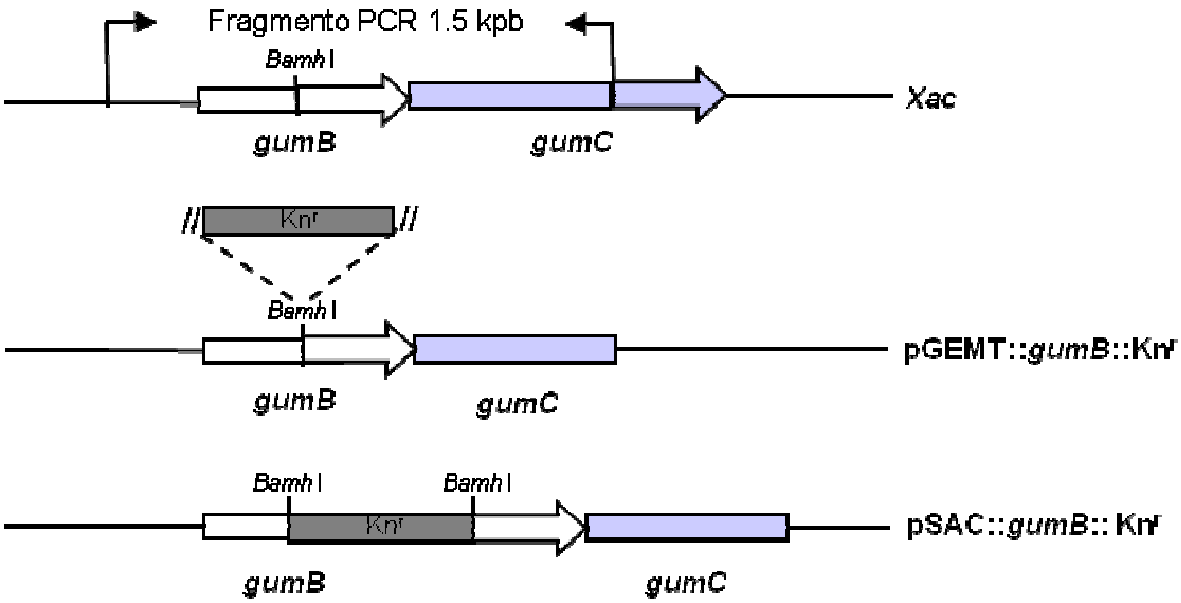
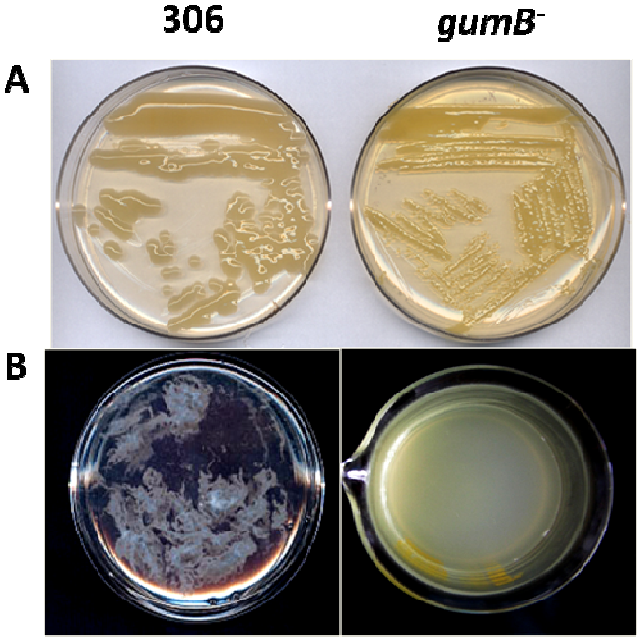


Figura 4.1: La mutante de *gumB*$^-$ se obtuvo por mutagénesis por intercambio alélico, en la cual el gen *gumB* fue reemplazado por recombinación homóloga por una copia que contiene un cassette de Kn^R.

Para evaluar si esta mutante mostraba una reducción en la síntesis de xantano se realizó una observación macroscópica de la cepa mutante a simple vista (Figura 4.2 A). Este análisis evidenció que la mutante *gumB*$^-$ tiene una deficiencia para producir xantano en un medio agar nutritivo; en este medio las colonias de la mutante *gumB*$^-$ son más pequeñas y muestran un aspecto seco, comparadas con la cepa salvaje *Xac* 306.

El xantano producido por las dos cepas fue precipitado (Figura 4.2 B) y luego se lo cuantificó (Figura 4.2 C). También se cuantificó la cantidad de xantano producido por la cepa mutante complementada con el *cluster* completo de genes *gum* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

.



C

Cepa	Producción xantano (g/l)
Xac 306	8,2
Xac gumB$^-$	0,15
Xac gumB$^-$ + pIZD15-261	9,1

Figura 4.2: (A) Crecimiento de la cepa salvaje *Xac* 306 y la mutante *gumB*$^-$ en medio Cadmus-agar. (B) Xantano obtenido a partir de los sobrenadantes de cultivo de la cepa salvaje *Xac* 306 y la mutante *gumB*$^-$ luego de preciptación con etanol. (C) Cuantificación de la cantidad de EPS producido por las distintas cepas (expresado como mg de xantano seco por ml de cultivo). El plásmido recombinante pIZD15-261 utilizado para complementar a la mutante *gumB*$^-$, posee el *cluster* completo *gum* de *Xcc* 8004.

Se encontraron diferencias significativas en la producción de xantano entre la cepa mutante *gumB*$^-$ (0,15 g/l) y la salvaje *Xac* 306 (8,2 g/l). La reversión al fenotipo silvestre de la mutante *gumB*$^-$, se indujo mediante la complementación con el plásmido recombinante pIZD15-261, que posee el "cluster" completo *gum* de *Xcc* [127, 141]. La mutante complementada, mostró una recuperación en la producción de xantano (9,1 g/l) a niveles semejantes a los de la cepa silvestre (Figura 4.2 C).

A través de curvas de crecimiento en medio Cadmus con agitación, se comprobó que la cepa mutante *gumB*$^-$ no perdió viabilidad con respecto a la cepa silvestre, creciendo a la misma velocidad que la misma (datos no mostrados).

4.2 Rol del xantano en la adhesión bacteriana a superficies bióticas y abióticas.

Para que un biofilm se desarrolle se requiere de la adhesión de las células a un substrato biótico o abiótico, y del contacto entre célula-célula que permite el inicio de la formación de pequeñas microcolonias [90, 91]. El desarrollo de estas biopelículas requiere de una serie de pasos altamente regulados, donde influyen factores físicos, ambientales y biológicos, entre ellos la producción de EPS [93].

Como primer paso se analizó la adhesión bacteriana a microplacas de poliestireno usando la técnica de tinción con cristal violeta [133]. Para ello, las bacterias fueron crecidas en medio Cadmus y luego diluidas en medio mínimo con el fin de realizar el ensayo de adhesión.

Como se muestra en la Figura 4.3, no se observaron diferencias significativas en la adhesión inicial (1 a 3 h) entre la bacteria *Xac* 306 y la mutante *gumB*$^-$. Sin embargo, a partir de las 12 h, el cultivo de la cepa *gumB*$^-$ mostró una adhesión a la superficie significativamente menor con respecto a la bacteria salvaje. Estos resultados sugieren que el xantano es importante, particularmente en las etapas más tardías, en la adhesión a superficies abióticas, y que la cepa mutante tiene problemas para adherirse a estas superficies.

A continuación, se evaluó la capacidad de adhesión de las bacterias a la superficie de hojas de limonero. Para ello, en nuestro laboratorio se desarrolló un método sencillo que permite estudiar la adhesión bacteriana *in vivo*. Para esto, se cortaron discos de hojas de plantas sanas de limonero y se dispusieron en cajas de petri, con la cara abaxial hacia abajo. Los discos fueron inoculados con la cepa salvaje 306 y la mutante *gumB*$^-$, e incubados a 28ºC. Después de 1, 3, 15 y 24 h de incubación, las bacterias adheridas fueron reveladas por tinción con cristal violeta y por

observación a simple vista se pudo tener una idea cualitativa del grado de adhesión a la superficie de la hoja.

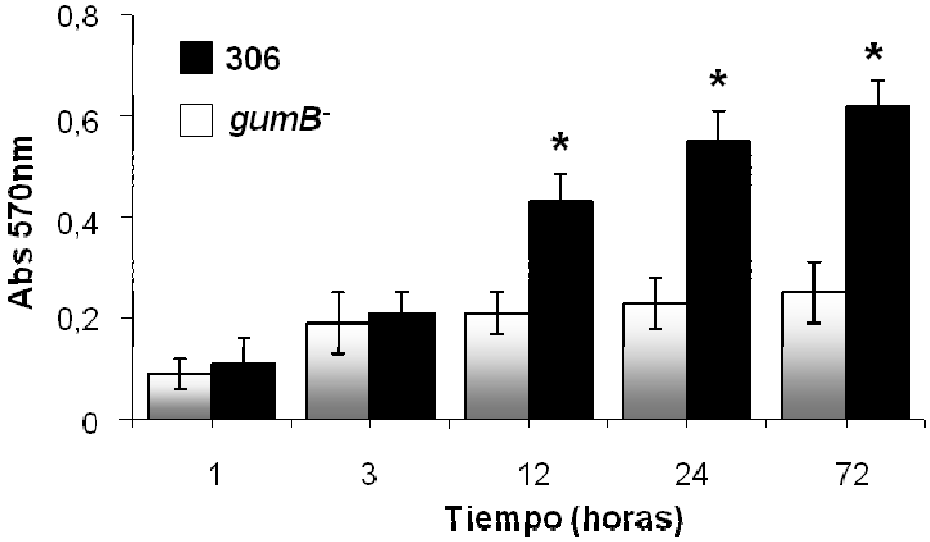


Figura 4.3: La adhesión bacteriana en microplacas inertes de poliestireno fue analizada por cristal violeta luego de 1, 3, 12, 24 y 72 h de incubación. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar, *n*=36. El conjunto de datos marcados con un asterisco es significativamente diferente. T test de Student: P< 0,05.

Como se observa en la Figura 4.4, el número de bacterias adheridas a la superficie de la hoja en el caso de la mutante *gumB*$^-$ difiere significativamente respecto de la cepa silvestre 306 después de 15 h de incubación. No se observaron diferencias cuando se comparó el crecimiento de *Xac* 306 con la mutante *gumB*$^-$ complementada con el plásmido pIZD15-261 (datos no mostrados).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el xantano de *Xac* cumple un rol fundamental en la adhesión bacteriana para el posterior desarrollo del biofilm, sugiriendo que la cepa defectiva en su biosíntesis podría ser incapaz de formar este tipo de estructuras.

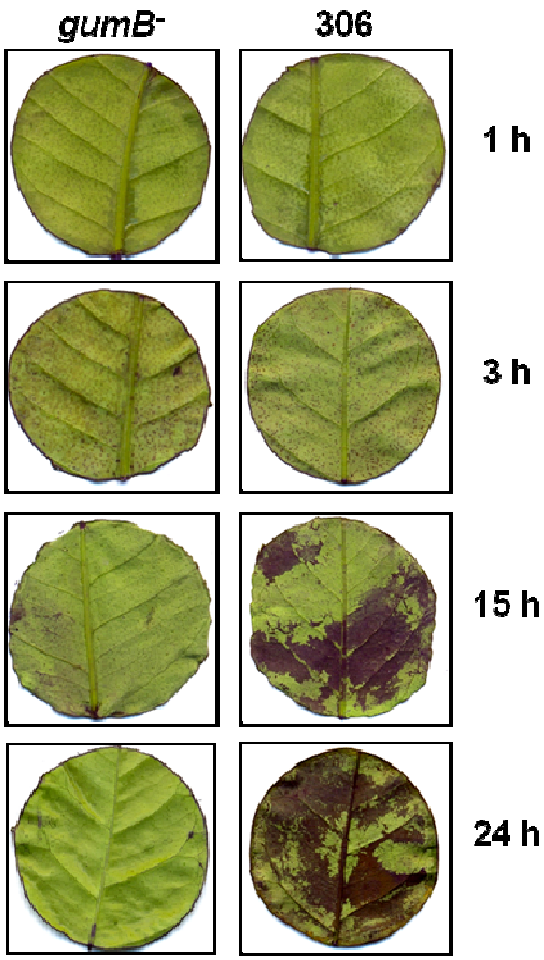


Figura 4.4: La adhesión bacteriana en la cara abaxial de hojas de limonero fue analizada por tinción con cristal violeta luego de 1, 3, 15 y 24 h de incubación. Las células bacterianas adheridas a la superficie de la hoja fueron analizadas macroscópicamente.

4.3 *Xanthomonas citri subsp. citri* requiere de la producción de xantano para formar estructuras tipo biofilm *in vitro.*

A fin de corroborar la idea propuesta en el párrafo anterior, nos propusimos analizar los diferentes estadios de formación de biofilm por *Xac* en ambas cepas.

En primer lugar se estudió si la cepa silvestre tiene la capacidad de formar biofilm, para ello se marcaron bacterias de la cepa *Xac* 306 con la proteína verde fluorescente (GFP) mediante la transformación de las mismas con un plásmido que porta el gen para esta proteína. Se utilizó para este ensayo un medio mínimo, intentando mimetizar el ambiente hostil que encuentran las bacterias en la superficie de las hojas, o en el apoplasto vegetal.

Se realizó un ensayo *in vitro* empleando la metodología descripta previamente por Russo y colaboradores [100]. Para ello, cultivos bacterianos de la cepa 306-GFP fueron cultivados sin agitación en cámaras con fondo de vidrio. El seguimiento del desarrollo de la estructura de los biofilms se realizó por microscopía confocal de escaneo láser (CLSM) en un microscopio confocal invertido (mas detalles de este procedimiento se pueden encontrar en la Sección 2.21 de esta Tesis).

Estadios claros del desarrollo y formación de biofilm fueron observados para la cepa 306-GFP en medio mínimo (Figura 4.5).

Como puede observarse en la figura, en la fase de adhesión inicial la mayoría de las bacterias se unen a la superficie del vidrio a través del polo celular (Figura 4.5-día 1). Seguido a esta etapa de adhesión, comenzó el crecimiento celular, acompañado por la división y presumiblemente migración celular.

Al segundo día de incubación, se observaron bacterias aisladas, microcolonias independientes y el comienzo de la formación de estructuras más complejas. Estas estructuras consistían en múltiples capas de células interaccionando unas con otras, principalmente a través de interacciones laterales e interacciones polo con polo. A los tres días, las células bacterianas formaron agrupamientos complejos de células interconectadas, cuya estructura se asemejaba al de un panal de abeja (Figura 4.5-día 3). Estos agrupamientos fueron aumentando en número, madurando, y creciendo con el tiempo evidenciando también cambios en la densidad bacteriana dentro del biofilm (Figura 4.5-día 4).

No obstante, la mutante en el gen *gumB* marcada con GFP y crecida bajo las mismas condiciones, fue incapaz de formar microcolonias y estructuras complejas, aún después del cuarto día de ensayo (Figura 4.5). Estos mismos resultados fueron observados en cuatro experimentos independientes.

Se comprobó anteriormente, que la complementación de la mutante *gumB*$^-$ con el plásmido pIZD15-261, revertía la producción normal de exopolisacárido en la mutante deficiente de xantano (Figura 4.2). Este plásmido permitió también recuperar la habilidad de la bacteria de formar agregados tipo biofilm en las mismas condiciones de crecimiento descriptas para 306-GFP y *gumB*$^-$-GFP según estudios de microscopía de fluorescencia no confocal (datos no mostrados).

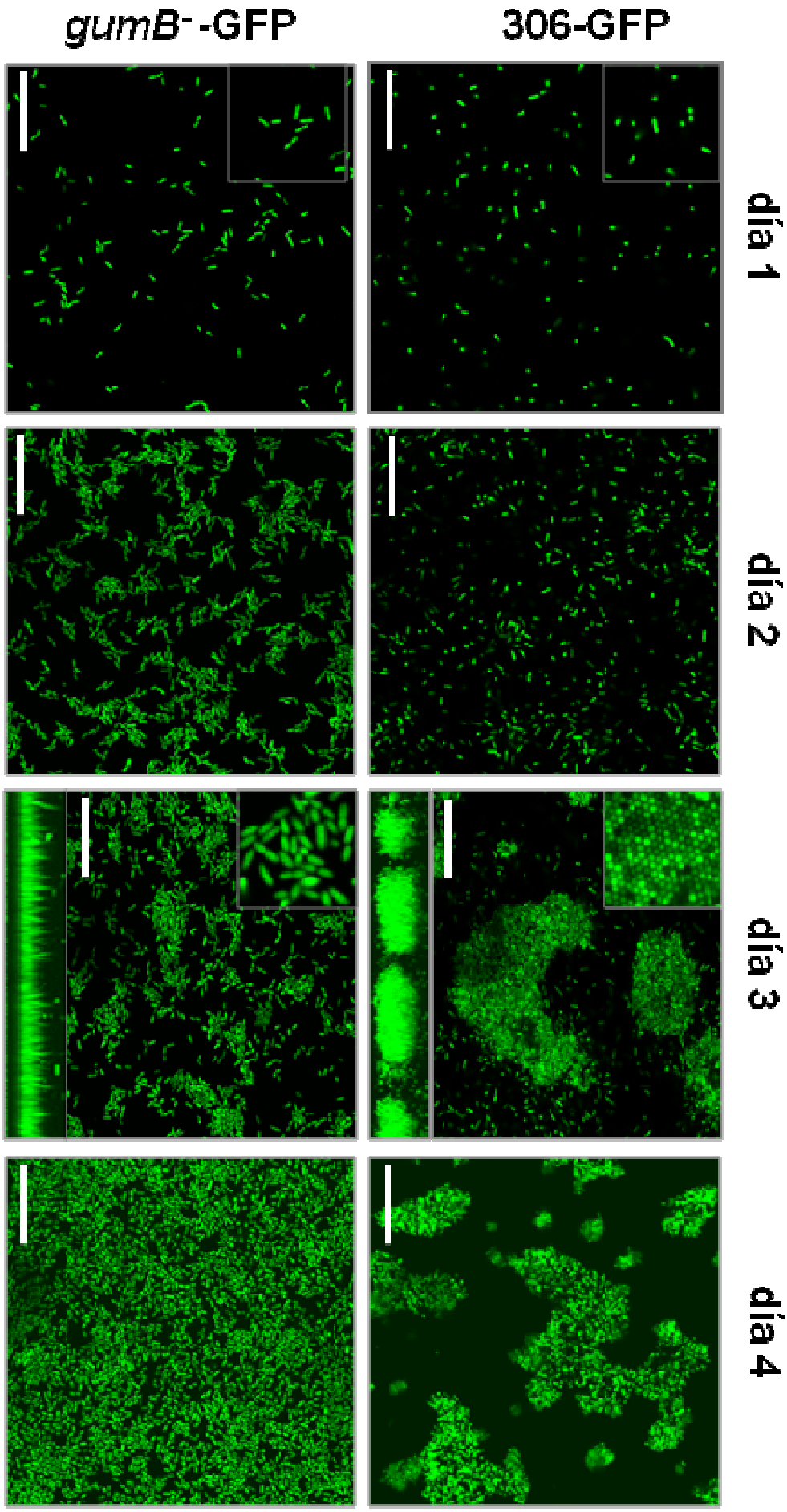

306-GFP
gumB⁻-GFP
día 1
día 2
día 3
día 4

Figura 4.5: Células que expresan la proteína GFP fueron analizadas por CLSM durante 4 días. Los paneles muestran células adheridas a la superficie de vidrio. En el día 3, la imagen que se encuentra en la parte superior del panel muestra en detalle la estructura tipo panal de abeja que forma la bacteria salvaje *Xac* 306, y la imagen el parte inferior muestra la proyección del biofilm en los planos x-z. Zooms (insertos), 4X de la imagen principal. Barra de escala 20µm. Un mínimo de cuatro experimentos independientes se realizó para cada una de las cepas, obteniéndose resultados similares.

Estas observaciones sugieren que la capacidad de formación y desarrollo de biofilm en *Xanthomonas citri* subsp. *citri* depende de la síntesis de xantano, por lo cual ahora contamos con una cepa deficiente en la formación de biofilms que nos permitirá estudiar cual es el rol de este tipo de comportamiento bacteriano en la virulencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

4.4 Biofilm y crecimiento epifítico durante la interacción *Xanthomonas citri* subsp. *citri-Citrus limón*

El crecimiento epifítico se define como el crecimiento bacteriano sobre la superficie de las plantas [103].

Este tipo de comportamiento ha evidenciado tener importancia en algunas interacciones planta-patógeno, ya que se ha demostrado que el biofilm aumenta la sobrevida de las bacterias en las superficies foliares, desde donde, cuando el medio ofrece las condiciones optimas para la infección, pueden iniciar la enfermedad [103, 142, 143].

A fin de estudiar el rol del biofilm en la interacción *Xac-Citrus limón*, analizamos la habilidad de *Xac* para formar agregados tridimensionales sobre la superficie de hojas de limonero. El desarrollo de biofilms fue monitoreado por CLSM durante un período de 25 días. La fluorescencia de GFP fue visible a las 24 h después de la inoculación por aspersión de las células epidérmicas. Los experimentos realizados mostraron estructuras similares a los biofilms observados *in vitro* a los 6 dpi (Figura 4.6). Se vieron células de *Xac* adheridas a la hoja de limonero perpendicular y horizontalmente, como también bacterias distribuidas al azar.

Las estructuras formadas por la cepa silvestre evidenciaron un arreglo tridimensional sobre, y en íntimo contacto con la superficie foliar, la cual se evidencia por la fluorescencia roja emitida por los cloroplastos.

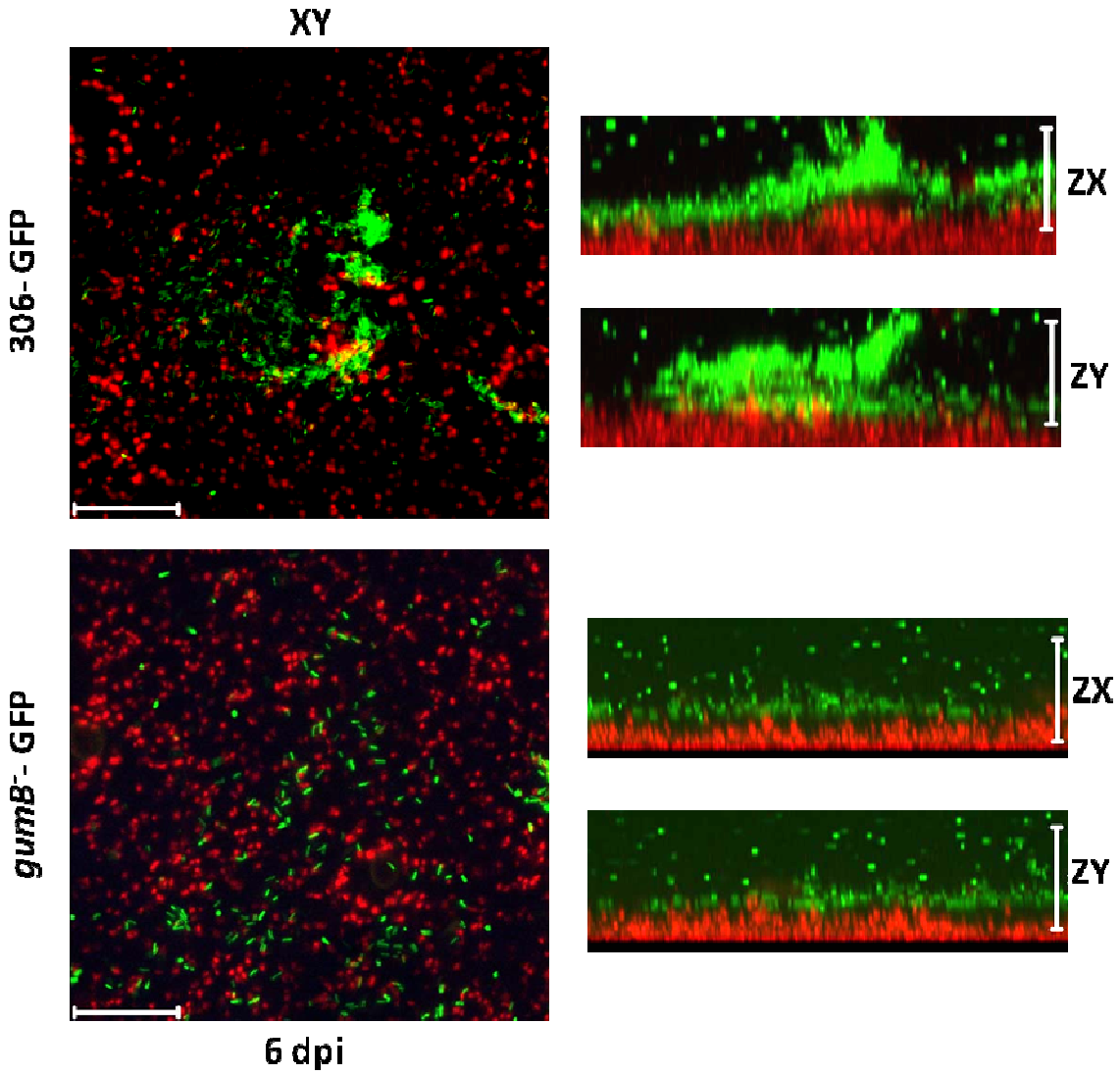


Figura 4.6: Análisis por CLSM de la cepa salvaje *Xac* 306 y la mutante *gumB*$^-$ sobre la superficie foliar a 6 días post-inoculación. XY, ZX y ZY son proyecciones de las imágenes de los ejes XY, ZX y ZY, respectivamente. Barra de escala, 20 µm.

De la misma manera que fue demostrado en el ensayo *in vitro*, la mutante deficiente en la producción de xantano creció como células solitarias y no formó microcolonias ni ningún tipo de estructuras sobre hojas de *Citrus limon* (Figura 4.6). Estos resultados corroboran que el xantano es necesario para la formación de biofilm tanto *in vitro* como *in vivo*.

Si evaluamos la formación de biofilms por la cepa silvestre de *Xac* en el tiempo sobre la superficie de la hoja (Figura 4.7) vemos que si bien los tiempos necesarios son mayores a los requeridos en los experimentos in vitro, posiblemente por la menor disponibilidad de nutrientes, la formación de biofilms muestra las mismas etapas en

ambos casos, comenzando por la adhesión a la superficie (día 1), siguiendo por la formación de microcolonias (día 3), para luego formar macrocolonias que darán lugar a la colonización tridimensional de la superficie (día 6). Es interesante notar que las bacterias en algunos casos se disponen cerca de los estomas, estructura por la cual se ha demostrado que *Xac* entra a la planta [44]. Sería posible que algún compuesto producido por los estomas actúe como quimioatractante, dirigiendo a las bacterias hacia estas estructuras.

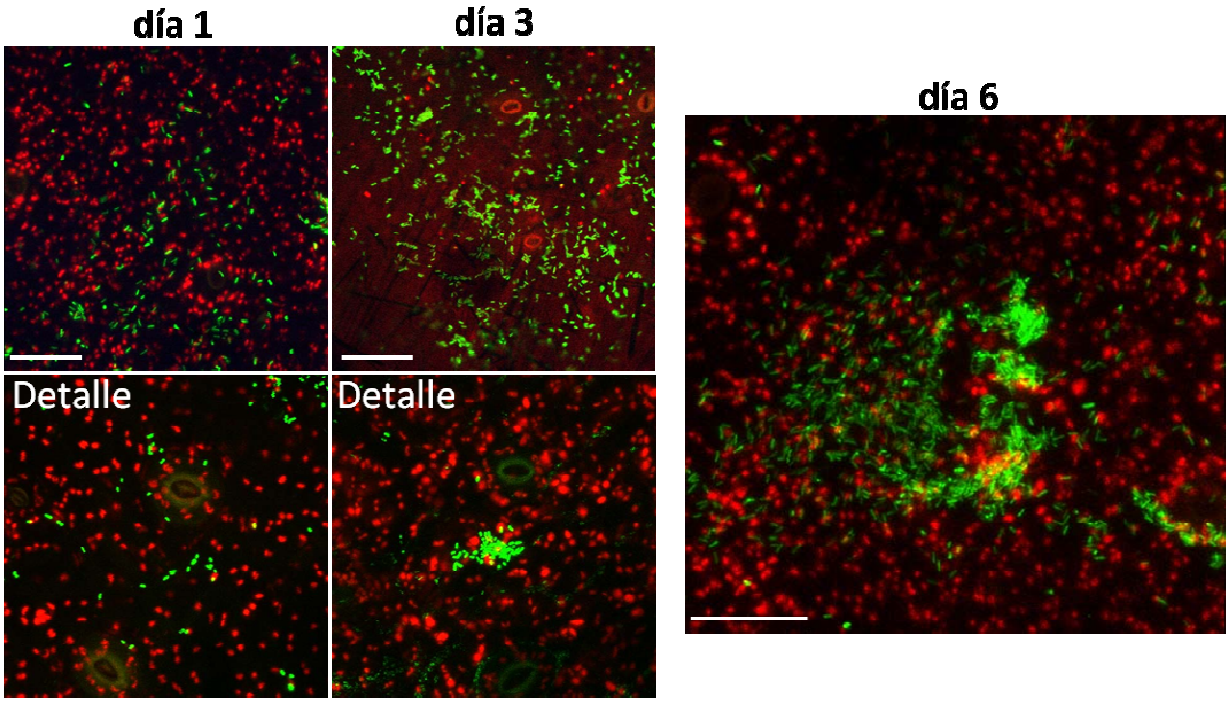


Figura 4.7: Análisis por CLSM de la cepa salvaje *Xac* 306 sobre la superficie foliar a 1, 3 y 6 días post-inoculación. Barra de escala, 20 µm.

Para determinar si el biofilm cumple un rol en la viabilidad epifítica de *Xac*, se monitoreo el número de células bacterianas en la superficie de hojas de *Citrus limón* durante 7 días. Como se observa en la Figura 4.8, a las 24 h después de la inoculación, la población epifítica de la bacteria salvaje *Xac* 306 aumentó significativamente, siendo casi 100 veces mayor a la de la mutante *gumB*$^-$. A partir del día 2, la población bacteriana de la cepa 306 se mantuvo constante, no así la población de la cepa *gumB*$^-$, la cual fue disminuyendo progresivamente. A los 7 dpi, la diferencia en el tamaño de las poblaciones fue de tres órdenes de magnitud. Estos datos demuestran que los

biofilms podrían estar protegiendo a las células bacterianas durante su crecimiento en la superficie de la hoja.

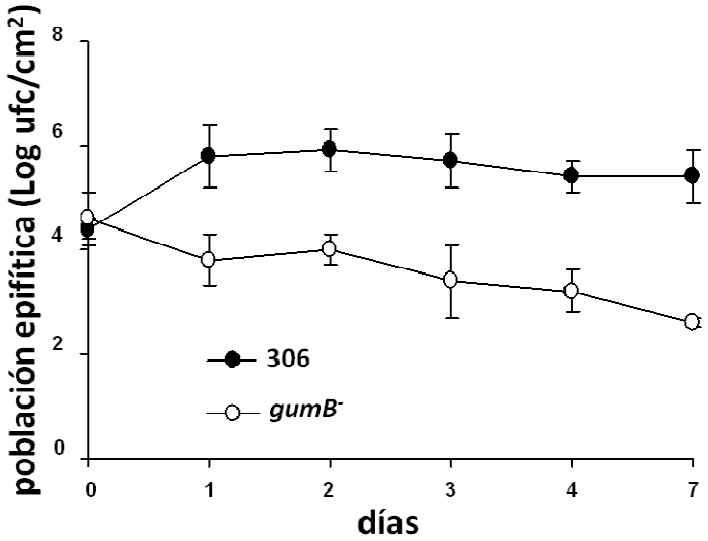


Figura 4.8: Crecimiento *in vivo* de la población epifítica de la cepa silvestre 306 y de la mutante *gumB*$^-$ en hojas de limonero. La población bacteriana fue cuantificada luego de lavar las hojas en una solución 10 mM de $MgCl_2$ y plaquear diluciones seriadas. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar.

4.5 La mutante defectiva en la formación de biofilm es menos patógena.

Para evaluar la importancia de la formación del biofilm en la virulencia de *Xac*, se inocularon hojas de limonero con suspensiones bacterianas de la cepa silvestre y la cepa incapaz de formar biofilms, a una concentración de $1x10^6$ UFC/ml. Este ensayo se realizó por tres métodos diferentes de inoculación: aspersión, herida seguida de aspersión e infiltración.

En la Figura 4.9 se muestran los cancros producidos por *Xac* cepa 306 en hojas de *Citrus limon* a los 30 dpi. Por otro lado, se observó que la mutante *gumB*$^-$ se encontró severamente comprometida en su habilidad para formar cancros, independientemente de la técnica de inoculación utilizada.

Curiosamente, en hojas sometidas a la técnica por infiltración, la mutante mostró un maceramiento acuoso del tejido alrededor del sitio de infección (Flecha), esto puede deberse a que es un método de inoculación poco natural e invasivo, que puede estar dañando el tejido vegetal, facilitando el desarrollo bacteriano.

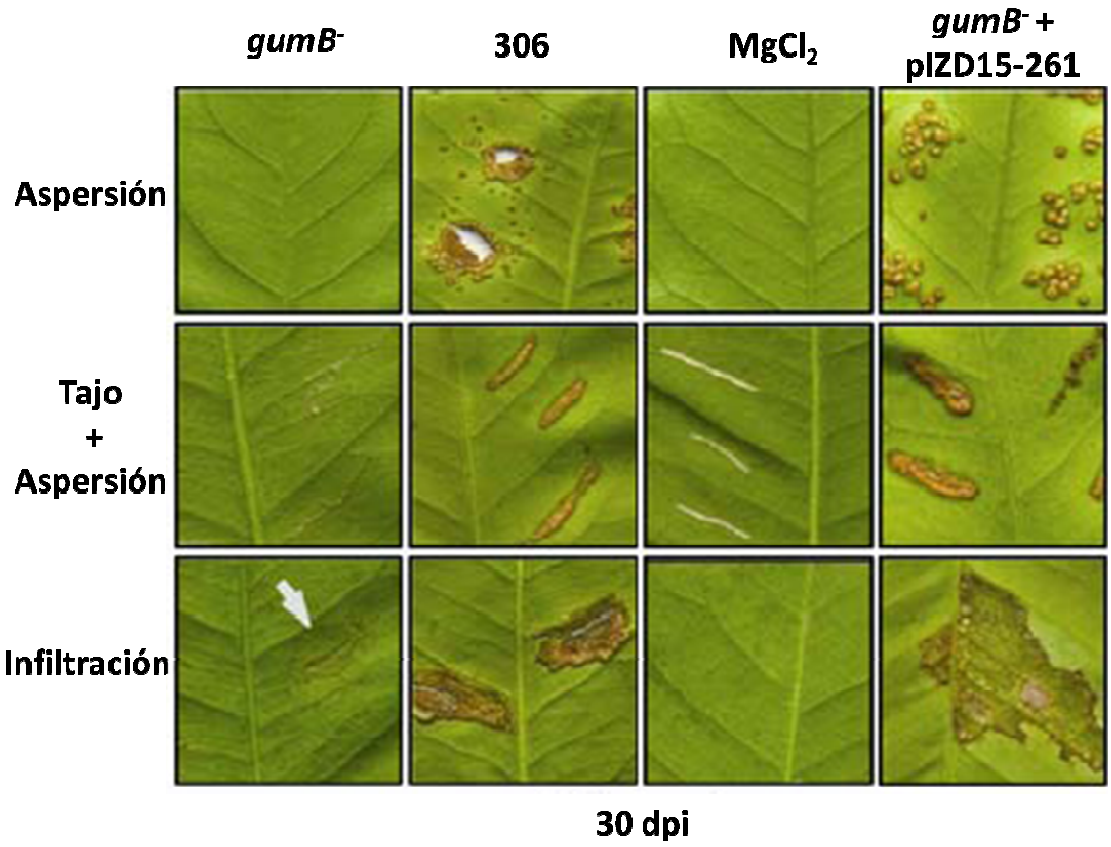


Figura 4.9: Síntomas de infección a los 30 dpi. Cara abaxial de hojas de limonero inoculadas con *Xac* 306, la mutante *gumB*$^-$ y la cepa *gumB*$^-$ complementada con el plásmido pIZD15-261 (*gumB*$^-$+ pIZD15-261). Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en una solución 10 mM de $MgCl_2$ e inoculadas utilizando tres métodos diferentes de inoculación: aspersión; tajo seguido de aspersión e infiltración.

Podemos ver que la mutante complementada con el *cluster* completo de genes *gum* (*gumB*$^-$ + pIZD15-261), recuperó la virulencia asemejándose al fenotipo salvaje.

Se procedió a la cuantificación de la población bacteriana en las hojas inoculadas con las distintas cepas por aspersión durante un periodo de 5 semanas post-inoculación (Figura 4.10). El número de bacterias en la hoja después de la inoculación por aspersión, no mostró diferencias significativas entre la cepa salvaje y la mutante *gumB*$^-$ hasta el día 14 post infección, momento a partir del cual comenzó a decrecer la población mutante hasta llegar a valores imperceptibles en la quinta semana de monitoreo. Al contrario, la bacteria salvaje continuó creciendo hasta aumentar más de seis órdenes de magnitud durante el período examinado.

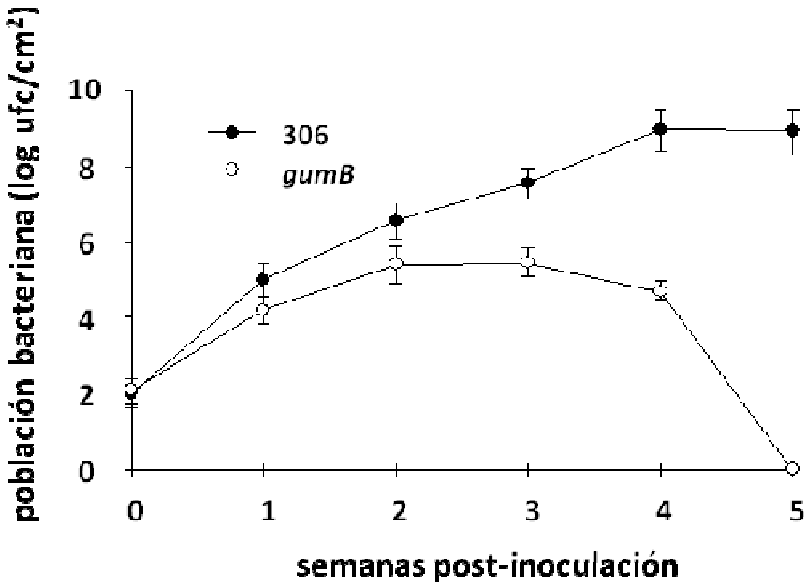


Figura 4.10: Cuantificación del crecimiento de las cepas de *Xac* en hojas de limonero inoculadas por aspersión. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar.

Estos resultados indicarían que al menos en parte, la virulencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* depende de la formación de biofilms, ya que la mutante que no los produce no es virulenta. Sin embargo no se puede descartar que el xantano esté ejerciendo algún rol en la virulencia *per se* y que la disminución en la virulencia de la cepa mutante esté también influenciada por este hecho.

4.6 El desarrollo del cancro cítrico está asociado a la formación de biofilm.

Para intentar dilucidar cómo se genera el cancro ante la infección por *Xac*, se procedió a estudiar por microscopía confocal secciones de hojas con cancro que habían sido artificialmente inoculadas por la cepa 306 expresando GFP.

La Figura 4.11 muestra un corte transversal de una hoja de cítrico conteniendo un cancro generado por la cepa 306-GFP. Como se puede ver hay una importante masa bacteriana creciendo dentro de la hoja, que incluso sale por fuera de la superficie abaxial de la misma. Se puede observar que el tejido está degradado y destruido, posiblemente por la acción de las enzimas degradativas que son secretadas por *Xac*.

Como se ha establecido en estudios previos, [44] la cancrosis bacteriana de los cítricos no es una enfermedad sistémica, es decir, la lesión sólo ocurre en el lugar donde ingresa y se multiplica la bacteria, esto es congruente con los resultados

obtenidos aquí, en donde observamos que solo hay multiplicación bacteriana en el sitio de la infección y no se aprecian bacterias movilizándose fuera de esta zona.

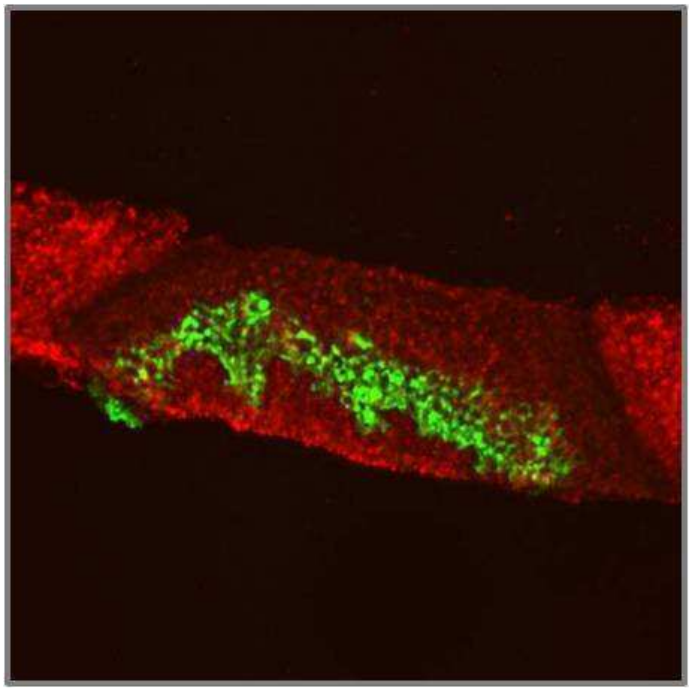


Figura 4.11: Microscopía confocal de una sección transversal de un cancro cítrico causado por la cepa 306-GFP. La imagen se tomó a los 25 días post-inoculación.

La masa bacteriana que se desarrolla dentro de la hoja parece exhibir las características generales de los biofilms bacterianos. Para investigar más profundamente esta posibilidad, se procedió a analizar la localización y la disposición de *Xac* en el tejido de la planta con síntomas mediante microscopía confocal en un mayor grado de detalle. Para ello, suspensiones bacterianas de 306-GFP fueron inoculadas por aspersión en hojas de limonero y su crecimiento monitoreado por microscopía confocal durante un período de 25 días.

Los experimentos realizados mostraron grandes agregados celulares durante el tiempo de formación del cancro (Figura 4.12)**.** Fenotípicamente, estos agregados de bacterias mostraron una estructura tridimensional con canales de agua, similar al observado previamente en los ensayos de microscopía confocal *in vitro*.

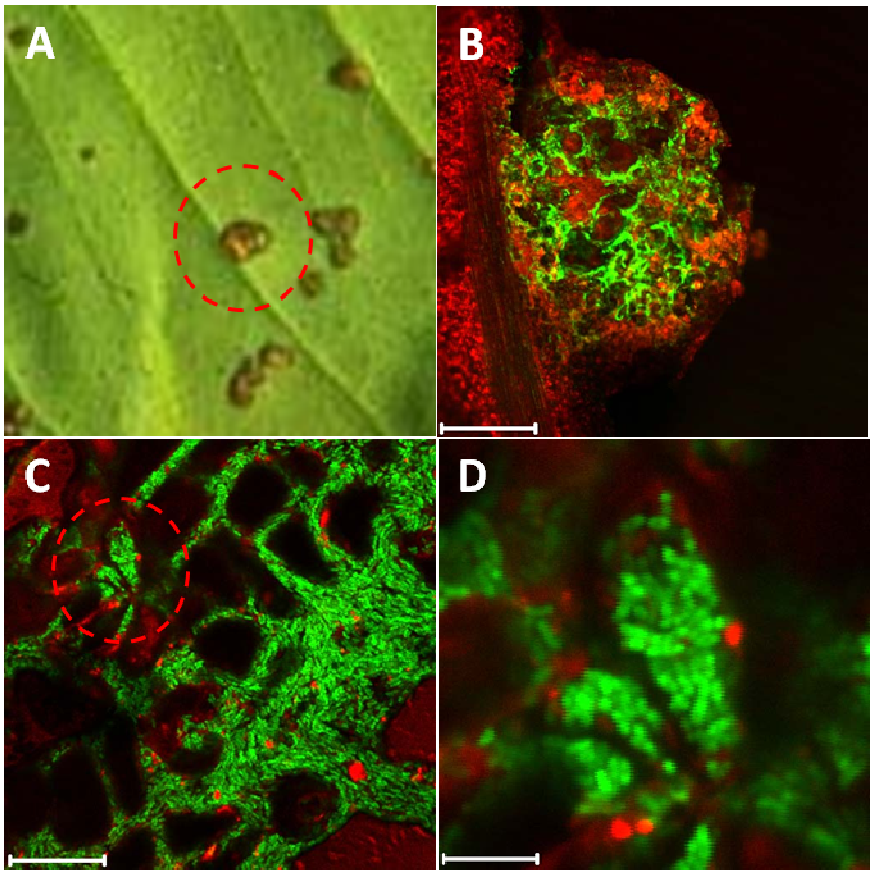


Figura 4.12: (A) La fluorescencia emitida por la cepa salvaje 306-GFP dentro de un cancro fue detectada por CLSM. Cada imagen muestra la distribución de las bacterias dentro del cancro a: (B) 100X, (C) 1.000X, (D) 4.000X. Las barras de escala son (B) 200 µm, (C) 20 µm y (D) 5 µm. Las áreas dentro de las líneas de puntos rojos dentro de los paneles A y C se muestran aumentadas en los paneles B y D, respectivamente. Las imágenes fueron tomadas a 25 días post-infección.

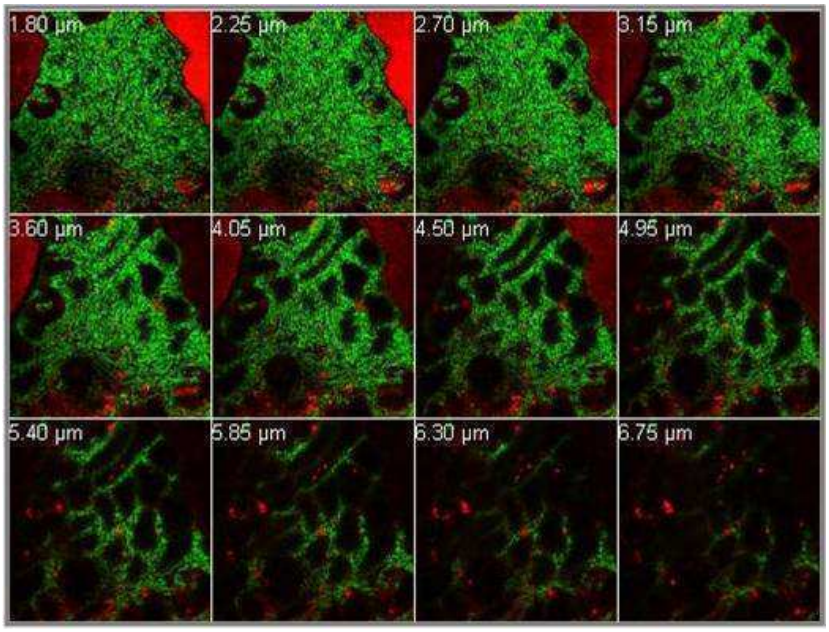


Figura 4.13: La bacteria salvaje 306-GFP se muestra dentro de un cancro a diferentes alturas desde la base. La altura está indicada en cada recuadro. Las imágenes fueron tomadas a 25 días post-infección.

En la Figura 4.13 se muestra un escaneo del biofilm formado por la cepa 306 *in vivo* a diferentes alturas, mediante el cual se puede apreciar la complejidad que tienen las estructuras bacterianas formadas dentro del cancro.

Una ampliación del biofilm formado por la cepa 306-GFP dentro del cancro, mostró células bacterianas adheridas a la superficie de la hoja y embebidas aparentemente dentro de una matriz polimérica (Figura 4.12D). Estos resultados sugieren que *Xac* se agrupa formando biofilms dentro del cancro, estas estructuras podrían estar actuando como protección de las defensas de la planta, y de esta forma proveen un ambiente óptimo para el desarrollo bacteriano dentro del hospedador.

Capítulo 5:

Desarrollo de un método de diagnóstico para la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos

Resumen:

Como ya se comentó en la introducción, la Cancrosis de los cítricos es una enfermedad cuarentenaria que produce grandes pérdidas a la citricultura de nuestro país. Para el control de la enfermedad es de vital importancia contar con métodos de diagnóstico que sean rápidos, confiables y económicos.

En este capítulo se detalla el desarrollo de un método de diagnóstico para las cepas bacterianas que causan esta enfermedad, que se basa en la reacción de *Loop Mediated Isothermal amplification* (LAMP), este método demostró ser altamente sensible y específico, pero con la ventaja de que no requiere equipamiento sofisticado para ser llevado a cabo, ni personal especializado. La mayor virtud del sistema desarrollado es que tiene la potencialidad de ser llevado a cabo en condiciones de campo, en las mismas plantaciones donde se está muestreando. Esta herramienta podría facilitar la tarea y aumentar la efectividad de las autoridades fitosanitarias que se encargan de controlar la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este capítulo forman parte de la siguiente publicación:
Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods.

Rigano LA, Marano MR, Castagnaro AP, Do Amaral AM, Vojnov AA.

BMC Microbiology. 2010 Jun 18;10:176.

El desarrollo realizado en este capítulo fue premiado en el concurso **INNOVAR 2010**, por el proyecto *Novedoso Método de Diagnóstico Molecular*, en la categoría Investigación Aplicada.

5.1 Diseño de cebadores para LAMP que permitan la detección específica de las bacterias causantes de la Cancrosis de los Cítricos.

La Cancrosis bacteriana de los Cítricos (CBC) es una enfermedad severa que causa grandes pérdidas económicas a los países productores de cítricos [89].

Hay tres tipos de CBC, las cuales tienen diferentes agentes causales. La CBC tipo A, originada en Asia, es causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* y es la forma más destructiva y diseminada de esta enfermedad, con un rango de huésped que incluye a todos los cultivares de cítricos [87]. La CBC tipo B es causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B, mientras que la CBC tipo C es causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C [87]. Estas últimas 2 cepas tienen un rango de huésped limitado y están restringidas geográficamente a Sudamérica. La CBC de tipo B está presente solo en Argentina, Uruguay y Paraguay y se la asocia mayormente a infecciones en limón y naranja, mientras que la CBC de tipo C está limitada al estado de Sao Paulo en Brasil e infecta Lima Mexicana [87].

Los síntomas causados por los tres tipos de CBC son similares y consisten de cancros rodeados por halos cloróticos y lesiones necróticas en frutas y hojas.

Selección de la secuencia de ADN apropiada para la detección.

Para el diseño de cebadores que permitan la detección de estas tres cepas bacterianas, nos focalizamos en el gen *pthA*, un conocido factor de virulencia presente en las cepas de *Xanthomonas* causantes de CBC [44, 46, 47, 144].

La proteína PthA (Figura 5.1) es un efector de tipo III que pertenece a la familia de efectores AvrBs3, estos efectores comparten características estructurales únicas: una serie de 5,5 - 28,5 repeticiones directas en tándem casi idénticas de 34 aminoácidos en la región central; un motivo de cierre de leucina C-terminal, tres secuencias señal de localización nuclear C-terminales, una región acídica C-terminal que funciona como activador transcripcional en eucariotas, y una región N-terminal que es importante para la secreción por sistemas de secreción de tipo III bacterianos [44-46].

Figura 5.1: Estructura general de miembros de la familia génica *avrBs3/pthA*. Representación esquemática de la proteína pthA. En amarillo se indican las repeticiones directas en tándem de la región central, en azul la región de cierre de leucina (LZ), en rojo las 3 secuencias de localización nuclear (NLS) y en negro el domino acídico C-terminal (AD).

El número exacto y arreglo de las unidades repetitivas difieren entre los miembros de esta familia, y se ha demostrado que son importantes para determinar la especificidad de hospedador [47].

El gen *pthA* es esencial para inducir la formación de cancros en cítricos [44]. La expresión transitoria de *pthA* en hojas de naranjo dulce originó los síntomas típicos de la enfermedad de CBC, hipertrofia e hiperplasia celular, y finalmente ruptura de la epidermis acompañada de muerte celular [44]. Esto indica, que *pthA* no sólo es necesario, sino también suficiente para generar los síntomas de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos [44].

Se ha demostrado, que todas las cepas de *Xanthomonas* que causan cancros en cítricos, tienen el gen *pthA* o un homólogo funcional [84, 145]. Cabe destacar, que otras *Xanthomonas* que infectan cítricos pero no producen cancro, como por ejemplo *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* y *Xanthomonas dieffenbachiae*, no poseen el gen *pthA* u homólogo alguno [44].

Estos resultados, indican que se podría realizar un diagnóstico de CBC a través de la detección del gen *pthA*, con lo cual se podrían detectar sólo las cepas formadoras de cancros.

Cabe destacar que otras cepas de *Xanthomonas* que no causan CBC ni atacan cítricos pueden poseer miembros de la familia génica de *pthA*, por ejemplo el gen *avrBs3*. No obstante, como estas *Xanthomonas* no infectan cítricos no resultaría ser un problema en la identificación y diagnóstico de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos [145].

Homólogos a *pthA* se han encontrado no sólo en el grupo de cepas tipo A de *Xanthomonas. citri* subsp. *citri,* sino que se han encontrado también en *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B y tipo C [46, 47]. El homólogo hallado en *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B se ha denominado *pthB* y el de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C se denominó *pthC*.

Todos estos homólogos isofuncionales de *pthA,* es decir *pthB* y *pthC*, son del mismo tamaño y poseen 17,5 repeticiones directas casi idénticas [44].

Diseño de los cebadores.

Se tomaron las secuencias de los genes homólogos a *pthA* correspondientes a las bacterias causantes de los tres tipos de CBC, se alinearon utilizando el programa ClustalX [146], y se eligió una región altamente conservada en todas las cepas para su amplificación por *Loop Mediated Isothermal Amplification*.

Como ya se mencionó en la introducción de la presente Tesis, la metodología de LAMP tiene la ventaja de detectar una secuencia de ADN mediante una incubación a 65˚C a temperatura constante [116], a diferencia de la PCR que requiere un ciclado de temperaturas en un aparato especialmente diseñado. En el caso de la LAMP con solo un baño térmico es suficiente para realizar la detección. Otra ventaja importante es el tiempo que toma la reacción, en el caso de la PCR insume entre reacción y detección del amplicón aproximadamente 5 horas, mientras que en el caso de la LAMP todo el proceso toma unos 40 minutos dependiendo del método de detección del amplicon utilizado.

El diseño de los cebadores se realizó utilizando el programa Primer Explorer versión 4 (Net Lab, Tokio, Japón), la ubicación de los mismos sobre la secuencia del gen *pthA* se muestra en la Figura 5.2 y sus secuencias y nombres se listan en la Tabla 2.3 de Materiales y Métodos.

CCGCGCAGGT GGATCTACGC ACGCTCGGCT ACAGCCAGCA GCAACAGGAG
449 F3 F2

AAGATCAAAC CGAAGGTTCG TTCGACAGTG GCGCAGCACC ACGAGGCACT
LF F1

GGTCGGCCAT GGGTTTACAC ACGCGCACAT CGTTGCGCTC AGCCAACACC
B1 LB

CGGCAGCGTT AGGGACCGTC GCTGTCAAGT ATCAGGACAT GATCGCAGCG
B2 B3 649

Figura 5.2: Ubicación de las secuencias reconocidas por los cebadores de LAMP sobre el gen *pthA*. Las posiciones relativas de este fragmento dentro del gen están indicadas en los extremos de la secuencia. F3,F2,LF,F1,B1,LB,B2 y B3 son los nombres asignados para las distintas regiones reconocidas por los cebadores.

5.2 Optimización de la reacción.

A continuación se procedió a ensayar distintas condiciones de reacción con la finalidad de encontrar las condiciones que permitan una amplificación rápida y eficiente. Las condiciones ensayadas fueron distintas temperaturas de reacción variando entre 60 y 65˚C, y la incorporación o no de *loop primers* a la muestra de reacción, la adición de estos cebadores adicionales tiene la ventaja de generar sitios adicionales para la iniciación de la reacción, aumentando así la velocidad de la misma [117].

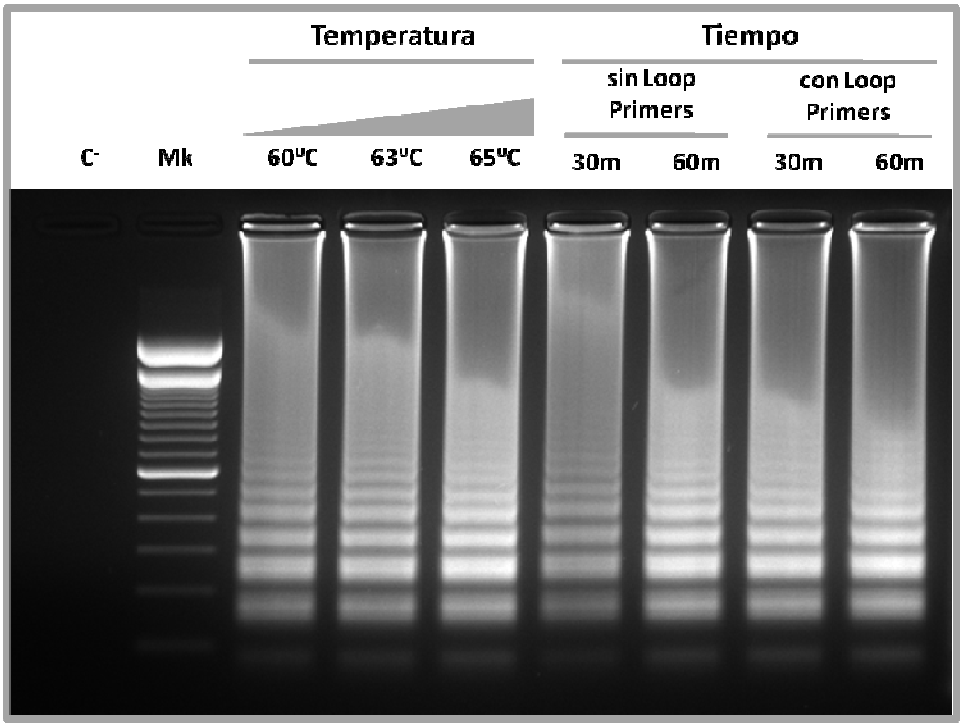


Figura 5.3: Gel de agarosa 1.5% mostrando los productos de LAMP obtenidos en las distintas condiciones de reacción. C^-: control negativo. Mk: marcador de peso molecular de 100 pb.

No se encontraron productos de reacción en la calle correspondiente al control sin ADN. La especificidad del producto amplificado se comprobó cortando y secuenciando algunas bandas (datos no mostrados).

Evaluación a simple vista.

Los productos de LAMP también se pueden detectar mediante la adición de SYBRGreenI a la mezcla de reacción luego de haber llevado a cabo la amplificación. En este caso el tubo en el que hubo una reacción positiva vira de color, de naranja a verde-amarillento, evento que puede ser observado a la luz del día y a simple vista (Figura 5.4 A).

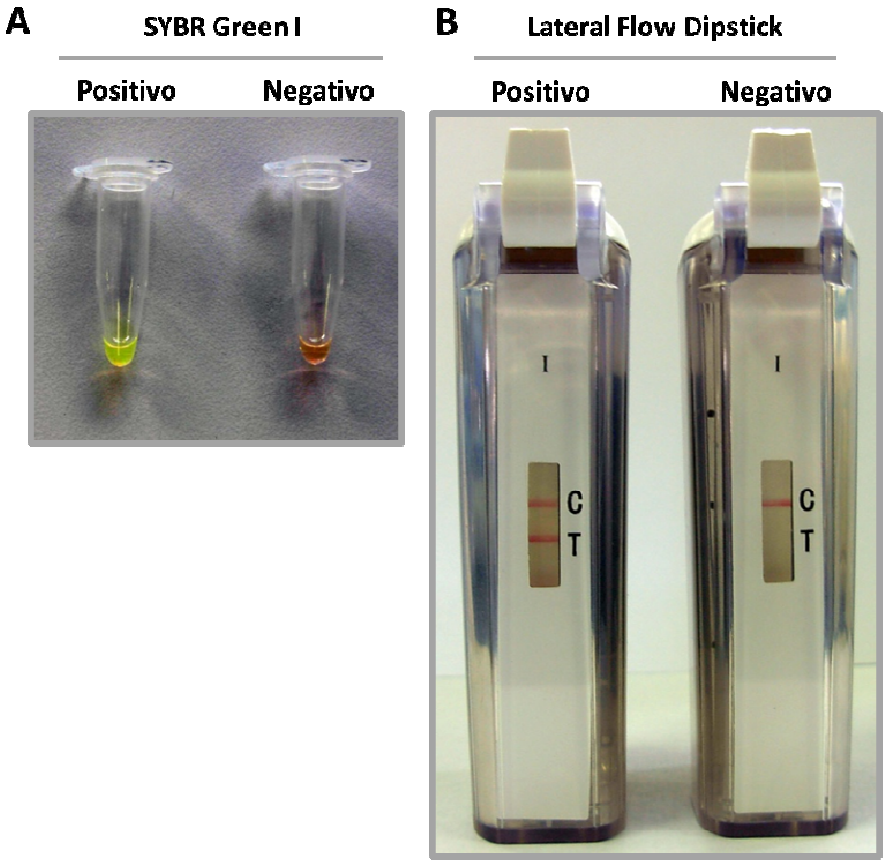


Figura 5.4: Evaluación a simple vista de la reacción de CBC-LAMP. (A) Tubos de reacción positivo y negativo teñidos con SYBRGreen I y evaluados bajo luz del día. (B) Reacciones positiva y negativa de CBC-LAMP evaluadas con LFD. C: línea control. T: línea *target*.

Para facilitar aun más el proceso de detección de los amplicones generados en la reacción, se puede utilizar la tecnología de tiras de tipo test de embarazo o *lateral flow dipsticks* (LFD). Este tipo de tecnología ya ha sido aplicado para la LAMP con éxito en trabajos recientes [147-150]. Para esto se utilizan los cebadores FIP y BIP (los de los extremos) marcados con biotina y fluoresceína respectivamente.

Al utilizar estos cebadores en la reacción de amplificación, los amplicones generados quedarán doblemente marcados, en un extremo tendrán biotina, y en el otro, fluoresceína. Al mezclarse el producto de reacción con el buffer de detección, conteniendo anticuerpos anti-fluoresceina acoplados a oro coloidal, los amplicones quedarán marcados con oro en uno de sus extremos. Al aplicarse esta mezcla a las tiras de LFD, los productos comenzarán a subir por capilaridad, y quedarán atrapados en una zona del LFD que contiene anticuerpos anti-biotina. Al acumularse los productos de reacción en esta zona, la concentración local de oro comienza a subir, haciendo que el mismo precipite formando una línea visible a simple vista. En los casos que no hubo amplificación no se formará ninguna línea ya que el oro no será atrapado. En este ensayo se utilizaron tiras de FLD genéricas disponibles comercialmente (Best Type I cassette, BioHelix, USA). En la Figura 5.4 B se puede apreciar el funcionamiento de este tipo de dispositivo en nuestro sistema. La amplificación positiva muestra dos bandas claramente visibles a simple vista, mientras que el control negativo muestra solo una banda correspondiente al control de flujo.

5.3 Evaluación de muestras de campo.

Se comenzó a evaluar el rendimiento de la reacción de CBC-LAMP en muestras de plantas con síntomas de CBC recolectadas en plantaciones de cítricos en la provincia de Tucumán, en este caso las muestras provenían de plantas de limón y naranja.

Luego de una extracción de ADN muy sencilla que incluye el uso de la resina CHELEX100, que tiene la capacidad de quelar muchos de los posibles inhibidores de la reacción que se pueden encontrar en el macerado del tejido vegetal, se procedió a la evaluación de las muestras por CBC-LAMP.

Explicado brevemente (Figura 5.5), el método de preparación de la muestra consistió en el maceramiento del tejido vegetal en buffer TE, seguido de la adición de una alícuota de la resina CHELEX100 (Biorad), luego de esto, se incubó la muestra a 56˚C por 15 minutos, para activar los sitios de unión de la resina.

Posteriormente se procedió a hervir la muestra por 5 minutos para ayudar a la disrupción de los tejidos y a la liberación del ADN. Luego de la sedimentación de los restos celulares por gravedad, se tomó una alícuota del sobrenadante como muestra a analizar.

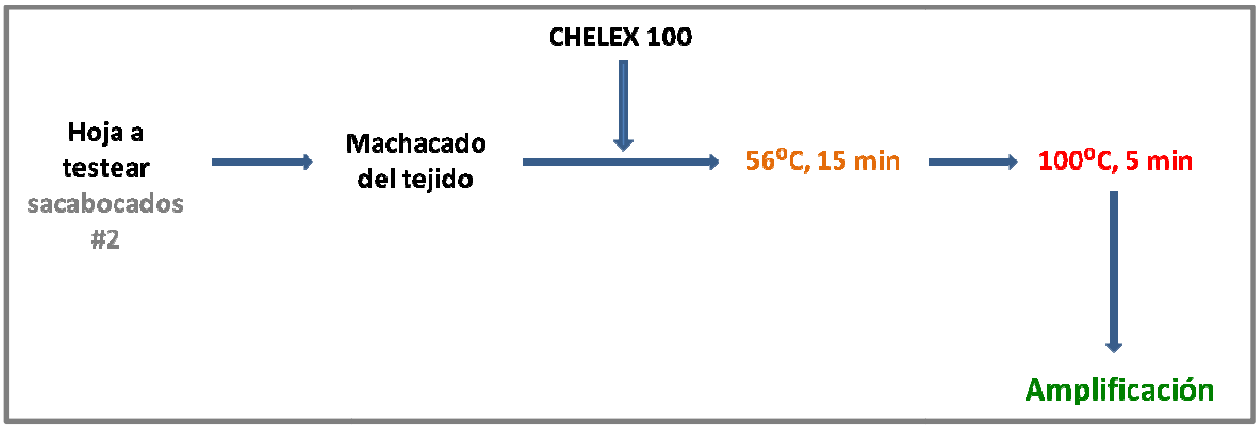


Figura 5.5: Procedimiento de preparación de las muestras para su análisis por CBC-LAMP.

Las muestras también fueron evaluadas por el método de cultivo microbiológico a modo de método de referencia, arrojando un resultado positivo.

Se utilizaron los tres métodos de evaluación de la reacción comentados hasta el momento, a saber, electroforesis en gel (GEL), tinción con SYBRGreenI (SG) y tiras de LFD (FLD).

La Figura 5.6 muestra que el método de CBC-LAMP fue capaz de detectar la enfermedad en todas las muestras evaluadas, independientemente de si la muestra consistió de tejido foliar o de fruto o si se trataba de limón o naranja. El control negativo realizado a partir de ADN de plantas sanas no evidenció producto de amplificación alguno.

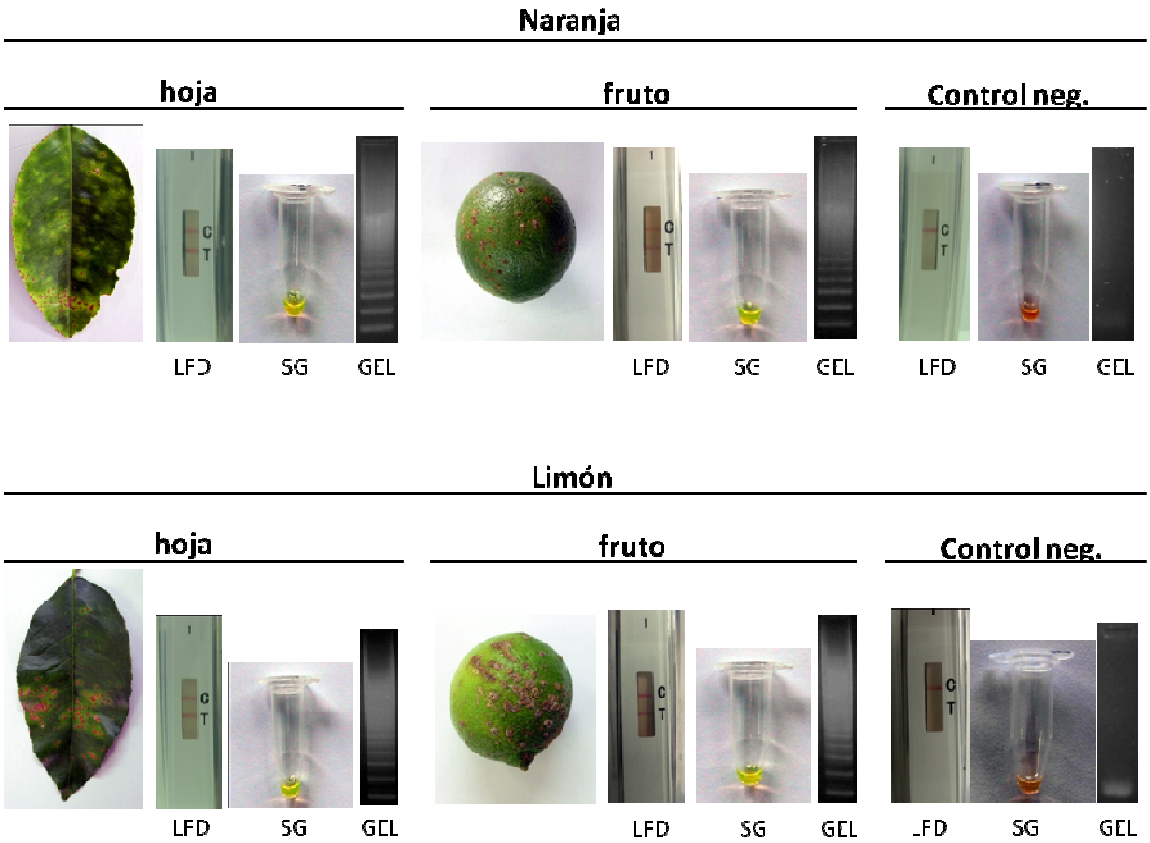


Figura 5.6: Evaluación de muestras de campo por el método de CBC-LAMP. LFD: lateral flow dipstick. SG: SYBRGreenI. GEL: electroforesis en gel. El control negativo consistió en ADN extraído de plantas sanas.

5.4 Pruebas de especificidad.

Se realizaron estudios de especificidad para comprobar que no se producía amplificación inespecífica con muestras de ADN de otros patógenos de plantas. Este evento es altamente indeseable en un método de diagnóstico, ya que podría dar resultados falsos positivos. Para esta evaluación de utilizaron muestras de ADN de patógenos de Cítricos, como *Xylella fastidiosa*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Phytophthora citrícola*, *Guignardia citricarpa* y *Elsinoe fawcettii*. También se utilizó ADN de otros patógenos vegetales, como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* y *Botrytis cinerea*. Para este análisis el ADN fue preparado mediante la utilización de un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Extraction Kit, Promega).

Especie	Cepa	Método de deteccion		
		Gel	LFD	SYBRGreen
Xanthomonas citri subsp. *citri*	306	+	+	+
Xylella fastidiosa	9a5c	–	–	–
Candidatus Liberibacter asiaticus	*	–	–	–
Xanthomonas campestris pv. *campestris*	8004	–	–	–
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*	85-10	–	–	–
Pseudomonas syringae	DC3000	–	–	–
Botrytis cinerea	B-191	–	–	–
Phytophthora citricola	*	–	–	–
Guignardia citricarpa	*	–	–	–
Elsinoe fawcettii	*	–	–	–

Tabla 5.1: Por cada muestra la reacción se llevo a cabo por triplicado. LFD: lateral flow dipstick. SG: SYBRGreenI. GEL: electroforesis en gel. *: Se utilizó ADN de plantas infectadas con el patógeno, pero sin síntomas de CBC. La concentración de ADN utilizada fué de 100ng.

En la Tabla 5.1 podemos apreciar que mientras que se obtuvo resultado positivo para la muestra de *Xanthomonas* citri *subsp*. *citri* (bacteria causante de CBC), se obtuvieron resultados negativos para todas las otras cepas de patógenos testeadas, sin importar el método de evaluación utilizado. Esto indica que la CBC-LAMP es una reacción altamente específica.

5.5 Pruebas de sensibilidad.

Se realizaron estudios de sensibilidad para definir cuál es el límite de detección de la CBC-LAMP en masa de ADN purificado, para esto se utilizaron diluciones seriadas de una muestra de ADN purificada de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 y se las evaluó

por CBC-LAMP. Para este análisis el ADN también fue preparado mediante la utilización del kit comercial.

Como se evidencia en la Tabla 5.2, el límite de detección para la CBC-LAMP evaluada por electroforesis en gel y por LFD fue de 10fg de ADN, mientras que en el caso de detección del amplicon por SYBRGreenI, cuando la masa de ADN cayó por debajo de 1pg el resultado fue una coloración que no era claramente distinguible del control negativo, por lo que concluimos que en este caso la sensibilidad fue menor.

Método de detección	**ADN purificado de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***								
	100ng	10ng	1ng	100pg	10pg	1pg	100fg	10fg	1fg
Gel	+	+	+	+	+	+	+	+	–
FLD	+	+	+	+	+	+	+	+	–
SYBRGreen	+	+	+	+	+	+	Nc	Nc	–

Tabla 5.2: Por cada muestra la reacción se llevo a cabo por triplicado. LFD: lateral flow dipstick. SG: SYBRGreenI. GEL: electroforesis en gel. +: reacción positiva. -: reacción negativa. Nc: el resultado no fue claro.

También se evaluó la sensibilidad del método utilizando como muestra cultivos bacterianos de *Xac* 306 y también utilizando hojas de limón infectadas artificialmente con la misma bacteria (Tabla 5.3).

Cepa	**Muestra**	**Método de detección**	**UFC por reacción** (diluciones seriadas)			
X. citri pv. *citri*	Cultivo puro		395,3	37,6	5,2	0,7
		Gel	+	+	+	–
		LFD	+	+	+	–
		SYBRGreenI	+	+	+	–

X. citri pv. *citri*	Tejido infectado		248,4	18,7	3,3	0,2
		Gel	+	+	–	–
		LFD	+	+	–	–
		SYBRGreenI	+	+	–	–

Tabla 5.3: Por cada muestra la reacción se llevo a cabo por triplicado. LFD: lateral flow dipstick. GEL: electroforesis en gel. +: reacción positiva. -: reacción negativa.

En estos dos casos el ADN fue preparado mediante el método de CHELEX100 explicado anteriormente, en el caso de los cultivos bacterianos, éstos fueron incorporados al procedimiento en el paso posterior al maceramiento del tejido en la Figura 5.5.

Se encontró que la sensibilidad a partir de cultivo puro de *Xac* 306 fue de aproximadamente 5 UFC por reacción, independientemente del método de detección utilizado, mientras que en el caso de tejido infectado, como era de esperar la sensibilidad fue ligeramente menor, llegando a detectar aproximadamente 19 UFC sin importar cuál fuera el método de detección utilizado.

5.6 Evaluación de una colección de cepas.

A continuación y para evaluar la robustez de nuestro método de diagnóstico realizamos una evaluación de una colección de cepas que incluyeron cepas de referencia de todos los tipos causantes de CBC, cepas relacionadas no causantes de CBC y una serie de aislados a campo de distintos orígenes geográficos (Tabla 5.4).

Especie	**Cepa(s)**	**Origen**			**Tipo de CBC**	**Método de detección**		
		Huésped	**Lugar**	**País**		**Gel**	**LFD**	**S G**
Xanthomonas citri subsp. *citri*	XC1CE	Mandarina	Concordia, Entre Rios	Argentina	A	+	+	+
	XC2COE	Naranja	Colon, Entre Rios	Argentina	A	+	+	+
	XC3AM-1 ,XC3AM-2	Limón	Apostoles, Misiones	Argentina	A	+	+	+

	XC4PM	Pomelo	Posadas, Misiones	Argentina	A	+	+	+
	XC5LF-1, XC5LF-2	Pomelo	Las Lomitas	Argentina	A	+	+	+
	XC7ETS-1, XC7ETS-2	Naranja	El Tabacal, Salta	Argentina	A	+	+	+
	XC8SPB-1, XC8SPB-2	Naranja	San Pedro, Buenos Aires	Argentina	A	+	+	+
	XC9CAT -1, XC9CAT-2	Naranja	Catamarca	Argentina	A	+	+	+
	XC10BVC -1, XC10BVC -2	Limón	Bella Vista, Corrientes	Argentina	A	+	+	+
	XC10BVC -3, XC10BVC -4, XC10BVC -5	Naranja	Bella Vista, Corrientes	Argentina	A	+	+	+
	XC10BVC -6, XC10BVC -7	Pomelo	Bella Vista, Corrientes	Argentina	A	+	+	+
	XC10BVC-8	Mandarina	Bella Vista, Corrientes	Argentina	A	+	+	+
	XC6FT-1, XC6FT-2, XCT2,XCT3,XCT7, XCT9,XCT18,XCT22,XCT31, XCT33, XCT42	Limón, hoja	Tucumán	Argentina	A	+	+	+
	XCT1, XCT17 ,XCT19, XCT21, XCT28, XCT29, XCT44	Limón, fruto	Tucumán	Argentina	A	+	+	+
	306 (sequenced strain)	--	--	Brazil	A	+	+	+
	625	--	Aratiba, Sao Paulo	Brazil	A	+	+	+
	1637	--	Embaúba, Sao Paulo	Brazil	A	+	+	+
	1740	--	--	China	A	+	+	+
	1801	--	--	Oman	A*	+	+	+
Xanthomonas fuscans subsp. *aurantifolii*	B832	--	--	Argentina	B	+	+	+
	382,1473	--	--	Brasil	C	+	+	+
Xanthomonas axonopodis pv. *citrumelo*	1925	--	--	USA	--	-	-	-

Tabla 5.4: Por cada muestra la reacción se llevo a cabo por triplicado. LFD: lateral flow dipstick. SG: SYBRGreenI. GEL: electroforesis en gel. +: reacción positiva. -: reacción negativa. Cuando se disponía de ella, información detallada acerca del origen geográfico y tipo de muestra fue indicada.

Como se puede ver en la Tabla 5.4, la CBC-LAMP fue capaz de detectar positivamente a una importante cantidad de aislados a campo de la cepa

Xanthomonas citri subsp. *citri*, causante de la Cancrosis de los Cítricos de tipo A provenientes de Argentina y de Brasil. De manera interesante el método también fue capaz de detectar la cepa 1801, una variante de la cepa A, llamada A* para la cual no fue orientado originalmente el presente método de diagnóstico, pero que también es causante de CBC, aunque en una forma menos severa [109].

La cepa 1925 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*, una bacteria altamente relacionada, pero causante de la Mancha Bacteriana de los Cítricos, y no de CBC, fue evaluada como negativa por el ensayo, esto es una muestra más de la gran especificidad del método aquí descripto.

El método detectó de manera positiva a las cepas *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* B y C, causante de CBC tipo B y C respectivamente, con estos resultados podemos decir que la CBC-LAMP es capaz de detectar todas las cepas causantes de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos.

Capítulo 6

Discusión

Capítulo 3: Rol del glucano cíclico de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la interacción con su hospedador.

La íntima relación entre plantas y fitopatógenos ha resultado en una co-evolución de un número de estrategias complejas para el ataque y la defensa. Para que un patógeno pueda colonizar a un hospedador exitosamente, debe desarrollar mecanismos que le permitan evitar su detección por las defensas del hospedador, o alternativamente, debe desarrollar estrategias para suprimir las defensas vegetales [151-153].

En esta tesis demostramos que el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* es un factor de virulencia que contribuye a la supresión de las defensas de la planta asociadas a la expresión de *PR1* y a la deposición de callosa.

Este patrón de actividad es similar al del efector secretado por el sistema de secreción de tipo III de *Pseudomonas syringae* AvrPto, el cual suprime la expresión de un conjunto de genes de *Arabidopsis thaliana que* codifican para proteínas involucradas en la defensa y en el refuerzo de la pared celular vegetal [54], pero difiere del mecanismo de acción de otro supresor como AvrPtoB, que induce la susceptibilidad a la enfermedad en *Nicotiana benthamiana* por medio de la supresión de la muerte celular asociada a la reacción de hipersensibilidad [56].

Nuestros resultados sugieren que el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas*, que es generado por las bacterias que están colonizando una hoja, puede ser translocado a otras hojas para inducir susceptibilidad, promoviendo y ayudando a la diseminación del patógeno por la planta entera.

La mínima dosis de glucano necesaria para establecer la supresión local fue de 10µg/ml, y la dosis necesaria para establecer la supresión sistémica fue de 30µg/ml. Estos datos podrían tener relevancia biológica, si tenemos en cuenta que *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* es capaz de producir cerca de 40µg/ml de glucanos cíclicos en un cultivo de dos días en medio mínimo (datos no mostrados).

La capacidad del glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* de moverse por la planta y actuar como un efector sistémico, lo distinguen de la mayoría de los efectores descriptos hasta el momento, los cuales sólo han demostrado actuar localmente. El único supresor que ha mostrado inducir susceptibilidad sistémica es la coronatina,

producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* [154], sin embargo no se ha demostrado todavía si esta toxina es translocada sistémicamente o ejerce su efecto vía la activación de la ruta del acido jasmónico [154].

La respuesta local inducida por patógenos avirulentos, cerca del sitio de infección, es acompañada típicamente del establecimiento de una respuesta de defensa sistémica, que da inmunidad contra patógenos normalmente virulentos y se la conoce como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) [155]. La naturaleza de la señal móvil responsable del establecimiento de SAR es desconocida. El acido salicílico participa en la respuesta local, pero la SAR no requiere de la translocación a larga distancia del acido salicílico para establecerse [26, 156]. Se ha demostrado recientemente que el jasmonato tiene un rol central en la defensa sistémica, posiblemente actuando como la señal inicial de la SAR [157].

La susceptibilidad sistémica inducida por el glucano cíclico β-(1,2) de *Xanthomonas* puede tener un profundo impacto en la severidad de la enfermedad, afectando la diseminación de las lesiones y promoviendo la capacidad del patógeno de diseminarse por el huésped. *Xanthomonas campestris* es capaz de moverse por el sistema vascular del huésped, lo cual apoya la teoría de que el glucano actúe como supresor sistémico.

La capacidad de los patógenos para establecer una susceptibilidad sistémica podría servir como una herramienta para contrarrestar la SAR.

En resumen, los resultados presentados aquí constituyen una nueva estrategia usada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* para comprometer la respuesta de defensa local y sistémica de la planta. Futuros experimentos podrán posibilitar la elucidación genética y bioquímica de este fenómeno, lo cual puede tener implicancias en el desarrollo de cultivares resistentes a *Xanthomonas* y otros agentes fitopatógenos.

Capítulo 4: Formación de biofilms en *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: Rol en la virulencia y la supervivencia epifítica.

En este Trabajo de Tesis Doctoral se demostró que la formación de biofilms está asociado a la virulencia y a la supervivencia epifítica en *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Para llegar a esta conclusión, primero se demostró que el exopolisacárido xantano producido por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* es esencial para la formación de microcolonias y posterior desarrollo de estructuras complejas del tipo biofilm, donde las bacterias están fuertemente empaquetadas en un arreglo del tipo panal de abeja, separado por canales de agua.

En los últimos años se ha demostrado que varios de los compuestos polisacáridos que conforman la matriz de las bacterias Gram-negativas cumplen un rol importante en la fisiología y persistencia de los biofilms. Como el ácido colánico en *E. coli* [158]; el alginato en *P. aeruginosa* [159]; la celulosa en *Salmonella* y *E. coli* [160, 161] y el EPS acídico en *R. leguminosarum* [100]. Consecuentemente, se puede concluir que los exopolisacáridos son compuestos fundamentales, que moldean y proveen de un soporte estructural a los biofilms bacterianos.

No obstante, las estructuras formadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* difieren del modo de crecimiento propuesto para otras especies, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus rubber* y *Proteus mirabilis*, en donde en la primera fase ocurre un crecimiento clonal, seguido en los últimos estadios por la agregación de las bacterias, formando finalmente una estructura que se asemeja al pie y cabeza de un hongo [162-164]. Probablemente, la diversidad en las arquitecturas de los biofilms refleja la adaptación de las bacterias a los diferentes microambientes.

Cabe destacar, que estas estructuras tridimensionales y ordenadas, se observaron tanto *in vitro* sobre una superficie de vidrio, como *in vivo* en la superficie de hojas de limonero. Este tipo de estructuras demostraron tener un rol fundamental en la supervivencia de las bacterias sobre las hojas. Sin la formación de biofilms, las bacterias mutantes *gumB*$^-$ no pudieron soportar las exigencias causadas por las condiciones adversas del medio, por lo cual, no pudieron sobrevivir en la superficie de la hoja tan exitosamente como la cepa silvestre. Este estadío de vida sobre la superficie foliar es llamado estadío epifítico [103] y se cree que es una estrategia de

muchos fitopatógenos que llegan por algún medio a la superficie foliar de sus hospedadores, y sobreviven sobre estas estructuras esperando que se den las condiciones óptimas para iniciar la infección [103, 142, 143].

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la mutante *gumB*$^-$, que no forma biofilms, tampoco desarrolla cancros en hojas de limonero cuando es inoculada por el método de aspersión y por el método de tajo seguido de aspersión. Cabe resaltar, que estos dos métodos reproducen las condiciones reales de lo que ocurre en la naturaleza, donde *Xac* ingresa al hospedador a través de aperturas naturales, como estomas y lesiones. Por el contrario, cuando se infiltró la mutante *gumB*$^-$ en hojas de limonero se observó una leve sintomatología. Estos resultados pueden ser explicados por la ruptura mecánica de las primeras barreras físicas de defensa de la planta: la cutícula y la pared celular.

La asociación entre formación de biofilms y virulencia se hizo incuestionable cuando, al observar bajo el microscopio confocal hojas con cancros, se evidenciaron grandes masas bacterianas creciendo dentro del mismo. Mediante un estudio más minucioso pudimos observar que dentro del cancro, las bacterias se encuentran formando estructuras de tipo biofilm similares a las observadas *in vitro*.

La vida en comunidad le confiere muchas ventajas a *Xanthomonas citri* en comparación con el estado planctónico o solitario. Los biofilms pueden actuar como defensa o mecanismo de supervivencia, o pueden facilitar la comunicación célula–célula y/o permitir el crecimiento en un ambiente adverso, como puede ser el apoplasto vegetal. Además, se demostró que el crecimiento bacteriano dentro de biofilms origina una gran diversidad genética [92], permitiendo que estas bacterias se puedan adaptar mejor a cambios ambientales repentinos que una población genéticamente homogénea.

Un estudio reciente sugiere que en *Xanthomonas citri* subsp. *citri,* el gen *gumD* (otro gen relacionado a la biosíntesis de xantano) está involucrado en la supervivencia epifítica de la bacteria en cítricos, pero no en su patogenicidad [165].

Estas diferencias en los resultados pueden deberse a las distintas plantas hospedantes utilizadas en ambos estudios (*Citrus sinensis* vs *Citrus limón*), a los distintos genes elegidos para construir las mutantes de *Xac* deficiente en la producción de xantano (*gumD* vs *gumB*), y por último, a los métodos de inoculación utilizados para

realizar los ensayos de fitopatogenicidad, que en el caso del estudio realizado sobre el gen *gumD* implicaron la utilización de métodos que no mimetizan las condiciones naturales de la infección.

Algunos estudios demostraron que mutantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en el gen *gumB* no producen xantano y muestran disminuida su patogenicidad [58, 59]. Asimismo, estas mutantes pierden su capacidad para crecer en hojas de plantas hospedadoras, como son *Brassica campestris*, *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* [62, 166], estos trabajos estarían apoyando nuestros resultados.

Cabe recordar, que en este trabajo se generó una mutante deficiente en la producción de xantano a través de la interrupción del gen *gumB*. La función de la proteína GumB es polimerizar un intermediario pentasacárido para generar finalmente, el xantano maduro [141]. Específicamente, la mutante *gumB*$^-$ acumularía el intermediario lipídico pentasacárido en formación. Sin embargo, no se puede descartar que el intermediario lipídico tenga efectos negativos en otras funciones adicionales que contribuyan a la virulencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Sin embargo, la acumulación de este intermediario no afecta a la viabilidad de la cepa mutante, ya que ésta crece en cultivo a la misma velocidad que la cepa silvestre.

En resumen, los resultados presentados aquí constituyen un ejemplo de cómo la formación de biofilms, permite a una bacteria fitopatógena colonizar la superficie foliar de su hospedador, para luego pasar a invadir su interior, y desde allí, protegida por el mismo tipo de estructura tridimensional, ejercer su acción patogénica sin ser destruida por las defensas del hospedador.

Capítulo 5: Desarrollo de un método de diagnóstico para la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos.

Argentina es el principal productor mundial de limones y la mayor actividad productiva se desarrolla en noroeste Argentino. La comercialización de la producción citrícola actualmente se encuentra limitada por la presencia de enfermedades y plagas cuarentenarias.

Una de estas enfermedades es la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos (CBC), cuyo control adquiere importancia estratégica, por la existencia de barreras sanitarias en el mercado internacional, que limitan severamente las oportunidades de exportación de la fruta fresca.

Como se comentó anteriormente, el éxito de los programas de erradicación de las enfermedades vegetales depende en gran manera de la detección temprana de los focos de infección. Para esto es fundamental el manejo eficiente de las muestras y su rápido análisis así como de disponer de un método de diagnostico que sea eficiente, económico y rápido.

Para llevar una solución a este problema se emprendió el desarrollo del método de diagnóstico para CBC desarrollado en el Capítulo 5 de esta tesis. Los resultados presentados muestran que se ha logrado desarrollar una herramienta para el diagnóstico de CBC que es robusta, sensible, específica e importantemente podría ser implementada para su uso en programas fitosanitarios que impliquen el muestreo y detección en condiciones de campo.

El uso del gen *pthA* ha demostrado ser muy eficiente y selectivo para la detección de las bacterias causantes de CBC, como ya se había demostrado anteriormente [109, 113, 145].

La sensibilidad obtenida en nuestro ensayo demostró ser mayor a la obtenida para la PCR convencional [110, 111], y comparable a la lograda con la PCR en tiempo real [109], aunque ya que estos datos surgen de la literatura, para corroborar estas afirmaciones se debería realizar un estudio en paralelo comparando ambas técnicas. La alta sensibilidad obtenida también puede significar un problema, ya que al ser tan sensible y a su vez tan eficiente para la generación de ADN, las posibilidades de contaminación por producto final son altas.

Los estudios de especificidad no han mostrado reacción cruzada con ningún otro patógeno de plantas o cítricos, esto se puede deber a que la LAMP reconoce varios sitios en el templado aumentando la especificidad por sobre métodos como la PCR. Un dato que ejemplifica la alta especificidad de la CBC-LAMP, es que cuando se analizó con nuestro método una muestra de ADN proveniente de *Xanthomonas citri* pv. *citrumelo*, una bacteria altamente relacionada pero no causante de CBC, el resultado obtenido fue negativo, esto puede ser debido a que estudios recientes no han podido encontrar un gen homólogo a *pthA* en esta bacteria [145].

Los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de la colección de aislamentos de argentina y el mundo evidencian la robustez del método aquí descripto.

La posibilidad de detectar los productos de amplificación a simple vista, ya sea usando la tinción con SYBRGreenI o con la tira de *lateral flow dipstick* (LFD) facilita mucho la utilización de esta técnica, además de hacerla más rápida y menos contaminante que los clásicos geles de agarosa utilizados para resolver productos de PCR. El tiempo estimado de detección por la CBC-LAMP es de aproximadamente 45 minutos, sin tener en cuenta la preparación de la muestra, esto implica una rapidez para la detección de CBC nunca reportada hasta el momento.

En resumen, se ha diseñado un método de diagnóstico para CBC que combina alta performance, especificidad y sensibilidad con sencillez y facilidad de implementación. Consideramos que este desarrollo será de utilidad para los programas fitosanitarios de nuestro país.

Capítulo 7

Bibliografía

1. Samac DA, Graham MA: **Recent advances in legume-microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective**. *Plant Physiol* 2007, **144**(2):582-587.
2. Pieterse CM, Dicke M: **Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology**. *Trends Plant Sci* 2007, **12**(12):564-569.
3. Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Frances J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C: **Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control**. *Int Microbiol* 2002, **5**(4):169-175.
4. Glazebrook J: **Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens**. *Annu Rev Phytopathol* 2005, **43**:205-227.
5. Jones JD, Dangl JL: **The plant immune system**. *Nature* 2006, **444**(7117):323-329.
6. Postel S, Kemmerling B: **Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns**. *Semin Cell Dev Biol* 2009, **20**(9):1025-1031.
7. Gohre V, Robatzek S: **Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity**. *Annu Rev Phytopathol* 2008, **46**:189-215.
8. Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ: **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response**. *Cell* 2006, **124**(4):803-814.
9. Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC: **Networking by small-molecule hormones in plant immunity**. *Nat Chem Biol* 2009, **5**(5):308-316.
10. Desender S, Andrivon D, Val F: **Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity?** *Cell Microbiol* 2007, **9**(1):21-30.
11. Gomez-Gomez L: **Plant perception systems for pathogen recognition and defence**. *Mol Immunol* 2004, **41**(11):1055-1062.
12. Zipfel C, Felix G: **Plants and animals: a different taste for microbes?** *Curr Opin Plant Biol* 2005, **8**(4):353-360.
13. Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G: **The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants**. *Plant Cell* 2004, **16**(12):3496-3507.
14. Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T: **Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis**. *Plant Cell* 2001, **13**(5):1155-1163.
15. Buttner D, Noel L, Thieme F, Bonas U: **Genomic approaches in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria allow fishing for virulence genes**. *J Biotechnol* 2003, **106**(2-3):203-214.
16. Trewavas AJ, Malho R: **Ca2+ signalling in plant cells: the big network!** *Curr Opin Plant Biol* 1998, **1**(5):428-433.
17. White PJ, Broadley MR: **Calcium in plants**. *Ann Bot* 2003, **92**(4):487-511.
18. Smith CJ: **Signal transduction in elicitation of phytoalexin synthesis**. *Biochem Soc Trans* 1994, **22**(2):414-419.
19. Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A: **Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in Nicotiana plumbaginifolia cells**. *Plant Cell* 2002, **14**(10):2627-2641.
20. Yang T, Poovaiah BW: **A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants**. *J Biol Chem* 2002, **277**(47):45049-45058.

21. Sakano K: **Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism**. *Int Rev Cytol* 2001, **206**:1-44.
22. Averyanov A: **Oxidative burst and plant disease resistance**. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009, **1**:142-152.
23. Apel K, Hirt H: **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction**. *Annu Rev Plant Biol* 2004, **55**:373-399.
24. Kawano T: **Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction**. *Plant Cell Rep* 2003, **21**(9):829-837.
25. van Loon LC, Rep M, Pieterse CM: **Significance of inducible defense-related proteins in infected plants**. *Annu Rev Phytopathol* 2006, **44**:135-162.
26. Ryals J, Lawton KA, Delaney TP, Friedrich L, Kessmann H, Neuenschwander U, Uknes S, Vernooij B, Weymann K: **Signal transduction in systemic acquired resistance**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(10):4202-4205.
27. Durrant WE, Dong X: **Systemic acquired resistance**. *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:185-209.
28. Bi YM, Kenton P, Mur L, Darby R, Draper J: **Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression**. *Plant J* 1995, **8**(2):235-245.
29. Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J: **Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction**. *Plant Cell* 1994, **6**(7):959-965.
30. Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK: **A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis**. *Nature* 2002, **419**(6905):399-403.
31. Vlot AC, Klessig DF, Park SW: **Systemic acquired resistance: the elusive signal(s)**. *Curr Opin Plant Biol* 2008, **11**(4):436-442.
32. van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM: **Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria**. *Annu Rev Phytopathol* 1998, **36**:453-483.
33. Pozo MJ, Azcon-Aguilar C: **Unraveling mycorrhiza-induced resistance**. *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**(4):393-398.
34. Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM: **Plant immune responses triggered by beneficial microbes**. *Curr Opin Plant Biol* 2008, **11**(4):443-448.
35. Conrath U, Beckers GJ, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ *et al*: **Priming: getting ready for battle**. *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**(10):1062-1071.
36. Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CM: **Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis**. *Mol Plant Microbe Interact* 2002, **15**(1):27-34.
37. Van Oosten VR, Bodenhausen N, Reymond P, Van Pelt JA, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CM: **Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in Arabidopsis**. *Mol Plant Microbe Interact* 2008, **21**(7):919-930.
38. Hann DR, Rathjen JP: **Early events in the pathogenicity of Pseudomonas syringae on Nicotiana benthamiana**. *Plant J* 2007, **49**(4):607-618.

39. Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY: **Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion**. *Cell* 2006, **126**(5):969-980.
40. Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F *et al*: **The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor**. *Plant Cell* 2009, **21**(8):2220-2236.
41. Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA: **Xanthomonas campestris overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor**. *Plant Physiol* 2009, **149**(2):1017-1027.
42. Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL: **Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria**. *Annu Rev Phytopathol* 2003, **41**:455-482.
43. Buttner D, Bonas U: **Port of entry--the type III secretion translocon**. *Trends Microbiol* 2002, **10**(4):186-192.
44. Brunings AM, Gabriel DW: **Xanthomonas citri: breaking the surface**. *Mol Plant Pathol* 2003, **4**(3):141-157.
45. Shiotani H, Fujikawa T, Ishihara H, Tsuyumu S, Ozaki K: **A pthA homolog from Xanthomonas axonopodis pv. citri responsible for host-specific suppression of virulence**. *J Bacteriol* 2007, **189**(8):3271-3279.
46. Al-Saadi A, Reddy JD, Duan YP, Brunings AM, Yuan Q, Gabriel DW: **All five host-range variants of Xanthomonas citri carry one pthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation**. *Mol Plant Microbe Interact* 2007, **20**(8):934-943.
47. El Yacoubi B, Brunings AM, Yuan Q, Shankar S, Gabriel DW: **In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene**. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**(5):1612-1621.
48. Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U: **A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator**. *Science* 2007, **318**(5850):648-651.
49. Romer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T: **Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene**. *Science* 2007, **318**(5850):645-648.
50. Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB: **Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta**. *Mol Microbiol* 2003, **50**(2):377-389.
51. Novatchkova M, Budhiraja R, Coupland G, Eisenhaber F, Bachmair A: **SUMO conjugation in plants**. *Planta* 2004, **220**(1):1-8.
52. Kim JG, Taylor KW, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA, Mudgett MB: **XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in xanthomonas-infected tomato leaves**. *Plant Cell* 2008, **20**(7):1915-1929.
53. Kay S, Bonas U: **How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant**. *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**(1):37-43.
54. Hauck P, Thilmony R, He SY: **A Pseudomonas syringae type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(14):8577-8582.
55. Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D: **Two Pseudomonas syringae type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis**. *Cell* 2005, **121**(5):749-759.

56. Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB: **Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death**. *EMBO J* 2003, **22**(1):60-69.
57. Newman MA, Daniels MJ, Dow JM: **Lipopolysaccharide from Xanthomonas campestris induces defense-related gene expression in Brassica campestris**. *Mol Plant Microbe Interact* 1995, **8**(5):778-780.
58. Chou FL, Chou HC, Lin YS, Yang BY, Lin NT, Weng SF, Tseng YH: **The Xanthomonas campestris gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot**. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **233**(1):265-269.
59. Katzen F, Ferreiro DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Puhler A, Ielpi L: **Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence**. *J Bacteriol* 1998, **180**(7):1607-1617.
60. Dharmapuri S, Yashitola J, Vishnupriya MR, Sonti RV: **Novel genomic locus with atypical G+C content that is required for extracellular polysaccharide production and virulence in Xanthomonas oryzae pv. oryzae**. *Mol Plant Microbe Interact* 2001, **14**(11):1335-1339.
61. da Silva FR, Vettore AL, Kemper EL, Leite A, Arruda P: **Fastidian gum: the Xylella fastidiosa exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity**. *FEMS Microbiol Lett* 2001, **203**(2):165-171.
62. Yun MH, Torres PS, El Oirdi M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA: **Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition**. *Plant Physiol* 2006, **141**(1):178-187.
63. Huang J, Carney BF, Denny TP, Weissinger AK, Schell MA: **A complex network regulates expression of eps and other virulence genes of Pseudomonas solanacearum**. *J Bacteriol* 1995, **177**(5):1259-1267.
64. Crossman L, Dow JM: **Biofilm formation and dispersal in Xanthomonas campestris**. *Microbes Infect* 2004, **6**(6):623-629.
65. Breedveld MW, Miller KJ: **Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae**. *Microbiol Rev* 1994, **58**(2):145-161.
66. Bohin JP: **Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria**. *FEMS Microbiol Lett* 2000, **186**(1):11-19.
67. Geremia RA, Cavaignac S, Zorreguieta A, Toro N, Olivares J, Ugalde RA: **A Rhizobium meliloti mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1----2) glucan**. *J Bacteriol* 1987, **169**(2):880-884.
68. Breedveld MW, Yoo JS, Reinhold VN, Miller KJ: **Synthesis of glycerophosphorylated cyclic beta-(1,2)-glucans by Rhizobium meliloti ndv mutants**. *J Bacteriol* 1994, **176**(4):1047-1051.
69. Banta LM, Bohne J, Lovejoy SD, Dostal K: **Stability of the Agrobacterium tumefaciens VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaption**. *J Bacteriol* 1998, **180**(24):6597-6606.
70. Swart S, Lugtenberg BJ, Smit G, Kijne JW: **Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an Agrobacterium tumefaciens chvB mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium**. *J Bacteriol* 1994, **176**(12):3816-3819.

71. Dylan T, Helinski DR, Ditta GS: **Hypoosmotic adaptation in Rhizobium meliloti requires beta-(1----2)-glucan**. *J Bacteriol* 1990, **172**(3):1400-1408.
72. Breedveld MW, Zevenhuizen LP, Zehnder AJ: **Synthesis of cyclic beta-(1,2)-glucans by Rhizobium leguminosarum biovar trifolii TA-1: factors influencing excretion**. *J Bacteriol* 1992, **174**(20):6336-6342.
73. Civerolo Sa (ed.): **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall; 1993.
74. Amemura A, Cabrera-Crespo J: **Extracellular oligosaccharides and low-Mr polysaccharides containing (1----2)-beta-D-glucosidic linkages from strains of Xanthomonas, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae**. *J Gen Microbiol* 1986, **132**(9):2443-2452.
75. Jung Y, Park H, Cho E, Jung S: **Structural analyses of novel glycerophosphorylated alpha-cyclosophorohexadecaoses isolated from X. campestris pv. campestris**. *Carbohydr Res* 2005, **340**(4):673-677.
76. Talaga P, Stahl B, Wieruszeski JM, Hillenkamp F, Tsuyumu S, Lippens G, Bohin JP: **Cell-associated glucans of Burkholderia solanacearum and Xanthomonas campestris pv. citri: a new family of periplasmic glucans**. *J Bacteriol* 1996, **178**(8):2263-2271.
77. Douglas CJ, Staneloni RJ, Rubin RA, Nester EW: **Identification and genetic analysis of an Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence region**. *J Bacteriol* 1985, **161**(3):850-860.
78. Puvanesarajah V, Schell FM, Stacey G, Douglas CJ, Nester EW: **Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of Agrobacterium tumefaciens**. *J Bacteriol* 1985, **164**(1):102-106.
79. Dylan T, Ielpi L, Stanfield S, Kashyap L, Douglas C, Yanofsky M, Nester E, Helinski DR, Ditta G: **Rhizobium meliloti genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in Agrobacterium tumefaciens**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**(12):4403-4407.
80. Stanfield SW, Ielpi L, O'Brochta D, Helinski DR, Ditta GS: **The ndvA gene product of Rhizobium meliloti is required for beta-(1----2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB**. *J Bacteriol* 1988, **170**(8):3523-3530.
81. Zorreguieta A, Ugalde RA: **Formation in Rhizobium and Agrobacterium spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in beta-D(1-2) glucan synthesis**. *J Bacteriol* 1986, **167**(3):947-951.
82. Zorreguieta A, Geremia RA, Cavaignac S, Cangelosi GA, Nester EW, Ugalde RA: **Identification of the product of an Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence gene**. *Mol Plant Microbe Interact* 1988, **1**(3):121-127.
83. Williamson G, Damani K, Devenney P, Faulds CB, Morris VJ, Stevens BJ: **Mechanism of action of cyclic beta-1,2-glucan synthetase from Agrobacterium tumefaciens: competition between cyclization and elongation reactions**. *J Bacteriol* 1992, **174**(24):7941-7947.
84. Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW: **An Xanthomonas citri pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts**. *Mol Plant Microbe Interact* 1992, **5**(3):204-213.
85. Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS: **Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker**. *Mol Plant Pathol* 2004, **5**(1):1-15.

86. Lee IJ, Kim KW, Hyun JW, Lee YH, Park EW: **Comparative ultrastructure of nonwounded Mexican lime and Yuzu leaves infected with the citrus canker bacterium Xanthomonas citri pv. citri**. *Microsc Res Tech* 2009, **72**(7):507-516.
87. Moreira LM, Almeida NF, Jr., Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AC, da Silva AM, de Moraes FE, de Oliveira JC *et al*: **Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii**. *BMC Genomics*, **11**:238.
88. Moreira LM, Almeida NF, Jr., Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AC, da Silva AM, de Moraes FE, de Oliveira JC *et al*: **Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii**. *BMC Genomics*, **11**(1):238.
89. Gottwald TR, Hughes G, Graham JH, Sun X, Riley T: **The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species**. *Phytopathology* 2001, **91**(1):30-34.
90. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R: **Biofilms: the matrix revisited**. *Trends Microbiol* 2005, **13**(1):20-26.
91. Parsek MR, Fuqua C: **Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life**. *J Bacteriol* 2004, **186**(14):4427-4440.
92. Boles BR, Thoendel M, Singh PK: **Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(47):16630-16635.
93. Camilli A, Bassler BL: **Bacterial small-molecule signaling pathways**. *Science* 2006, **311**(5764):1113-1116.
94. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK: **The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing**. *J Immunol* 2005, **175**(11):7512-7518.
95. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Heydorn A, Molin S, Pitts B, Stewart PS: **Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms**. *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**(10):6188-6196.
96. Kihara K, Mori K, Suzuki S, Ono N, Furusawa C, Yomo T: **Global/temporal gene expression analysis of Escherichia coli in the early stages of symbiotic relationship development with the cellular slime mold Dictyostelium discoideum**. *Biosystems* 2009, **96**(2):141-164.
97. Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW: **Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms**. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(12):5608-5613.
98. Sauer K: **The genomics and proteomics of biofilm formation**. *Genome Biol* 2003, **4**(6):219.
99. Sutherland I: **Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework**. *Microbiology* 2001, **147**(Pt 1):3-9.
100. Russo DM, Williams A, Edwards A, Posadas DM, Finnie C, Dankert M, Downie JA, Zorreguieta A: **Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by Rhizobium leguminosarum**. *J Bacteriol* 2006, **188**(12):4474-4486.

101. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. *Science* 1999, **284**(5418):1318-1322.
102. Parsek MR, Singh PK: **Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis**. *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:677-701.
103. Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C: **Biofilm formation in plant-microbe associations**. *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**(6):602-609.
104. Harding NE, Cleary JM, Cabanas DK, Rosen IG, Kang KS: **Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in Xanthomonas campestris**. *J Bacteriol* 1987, **169**(6):2854-2861.
105. Katzen F, Becker A, Zorreguieta A, Puhler A, Ielpi L: **Promoter analysis of the Xanthomonas campestris pv. campestris gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide**. *J Bacteriol* 1996, **178**(14):4313-4318.
106. Vojnov AA, Slater H, Daniels MJ, Dow JM: **Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in Xanthomonas campestris and its regulation in planta**. *Mol Plant Microbe Interact* 2001, **14**(6):768-774.
107. Pollock TJ, Thorne L, Yamazaki M, Mikolajczak MJ, Armentrout RW: **Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides**. *J Bacteriol* 1994, **176**(20):6229-6237.
108. Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, Salzberg SL, Leach JE, Sonti R *et al*: **Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in xanthomonas**. *PLoS One* 2008, **3**(11):e3828.
109. Mavrodieva V, Levy L, Gabriel DW: **Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples**. *Phytopathology* 2004, **94**(1):61-68.
110. Hartung JS, Daniel JF, Pruvost OP: **Detection of Xanthomonas campestris pv. citri by the polymerase chain reaction method**. *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**(4):1143-1148.
111. Coletta-Filho HD, Takita MA, Souza AA, Neto JR, Destefano SA, Hartung JS, Machado MA: **Primers based on the rpf gene region provide improved detection of Xanthomonas axonopodis pv. citri in naturally and artificially infected citrus plants**. *J Appl Microbiol* 2006, **100**(2):279-285.
112. Cubero J, Graham JH, Gottwald TR: **Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker**. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(6):2849-2852.
113. Cubero J, Graham JH: **Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate xanthomonas strains on citrus**. *Phytopathology* 2005, **95**(11):1333-1340.
114. Golmohammadi M, Cubero J, Penalver J, Quesada JM, Lopez MM, Llop P: **Diagnosis of Xanthomonas axonopodis pv. citri, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods**. *J Appl Microbiol* 2007, **103**(6):2309-2315.
115. Rigano LA, Marano MR, Castagnaro AP, Do Amaral AM, Vojnov AA: **Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods**. *BMC Microbiol*, **10**:176.

116. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T: **Loop-mediated isothermal amplification of DNA**. *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(12):E63.
117. Nagamine K, Hase T, Notomi T: **Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers**. *Mol Cell Probes* 2002, **16**(3):223-229.
118. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T: **Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances**. *J Biochem Biophys Methods* 2007, **70**(3):499-501.
119. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T: **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products**. *Nat Protoc* 2008, **3**(5):877-882.
120. Rigano LA, Payette C, Brouillard G, Marano MR, Abramowicz L, Torres PS, Yun M, Castagnaro AP, Oirdi ME, Dufour V *et al*: **Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses**. *Plant Cell* 2007, **19**(6):2077-2089.
121. da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM *et al*: **Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities**. *Nature* 2002, **417**(6887):459-463.
122. Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendin L, Filippone P, Torres PS, Questa J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA *et al*: **Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in Xanthomonas axonopodis pv. citri**. *Mol Plant Microbe Interact* 2007, **20**(10):1222-1230.
123. Quandt J, Hynes MF: **Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria**. *Gene* 1993, **127**(1):15-21.
124. Prentki P, Krisch HM: **In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment**. *Gene* 1984, **29**(3):303-313.
125. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, Peterson KM: **Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes**. *Gene* 1995, **166**(1):175-176.
126. Stuurman N, Pacios Bras C, Schlaman HR, Wijfjes AH, Bloemberg G, Spaink HP: **Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants**. *Mol Plant Microbe Interact* 2000, **13**(11):1163-1169.
127. Vojnov AA, Bassi DE, Daniels MJ, Dankert MA: **Biosynthesis of a substituted cellulose from a mutant strain of Xanthomonas campestris**. *Carbohydr Res* 2002, **337**(4):315-326.
128. Kidby D, Sandford P, Herman A, Cadmus M: **Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: Xanthomonas campestris NRRL B-1459**. *Appl Environ Microbiol* 1977, **33**(4):840-845.
129. Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ: **A novel regulatory system required for pathogenicity of Xanthomonas campestris is mediated by a small diffusible signal molecule**. *Mol Microbiol* 1997, **24**(3):555-566.
130. Tornero P, Dangl JL: **A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in Arabidopsis thaliana**. *Plant J* 2001, **28**(4):475-481.

131. Morris CE, Monier JM, Jacques MA: **A technique To quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere**. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(12):4789-4795.
132. Vojnov AA, Slater H, Newman MA, Daniels MJ, Dow JM: **Regulation of the synthesis of cyclic glucan in Xanthomonas campestris by a diffusible signal molecule**. *Arch Microbiol* 2001, **176**(6):415-420.
133. Davey ME, O'Toole G A: **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**(4):847-867.
134. Rigano L: **Rol del glucano cíclico de *Xanthomonas* en la virulencia. Aspectos genéticos de su biosíntesis.** San Martín: Universidad Nacional de General San Martín; 2005.
135. Hammond-Kosack KE, Jones JD: **Resistance gene-dependent plant defense responses**. *Plant Cell* 1996, **8**(10):1773-1791.
136. Ton J, Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B: **Callose deposition: a multifaceted plant defence response**. *Mol Plant Microbe Interact*.
137. Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL: **Biofilm dispersal in Xanthomonas campestris is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(19):10995-11000.
138. Fujishige NA, Kapadia NN, De Hoff PL, Hirsch AM: **Investigations of Rhizobium biofilm formation**. *FEMS Microbiol Ecol* 2006, **56**(2):195-206.
139. Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H *et al*: **Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen Xanthomonas campestris pv. campestris**. *Genome Res* 2005, **15**(6):757-767.
140. Vojnov AA: **Síntesis de exopolisacáridos en *Xanthomonas* spp.** *Doctoral.* Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 1996.
141. Vojnov AA, Zorreguieta A, Dow JM, Daniels MJ, Dankert MA: **Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by Xanthomonas campestris**. *Microbiology* 1998, **144 (Pt 6)**:1487-1493.
142. Beattie GA, Lindow SE: **Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies**. *Phytopathology* 1999, **89**(5):353-359.
143. Lindow SE, Brandl MT: **Microbiology of the phyllosphere**. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(4):1875-1883.
144. Yang Y, Gabriel DW: **Xanthomonas avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals**. *Mol Plant Microbe Interact* 1995, **8**(4):627-631.
145. Cubero J, Graham JH: **Genetic relationship among worldwide strains of Xanthomonas causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR**. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(3):1257-1264.
146. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R *et al*: **Clustal W and Clustal X version 2.0**. *Bioinformatics* 2007, **23**(21):2947-2948.
147. Puthawibool T, Senapin S, Kiatpathomchai W, Flegel TW: **Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick**. *J Virol Methods* 2009, **156**(1-2):27-31.

148. Jaroenram W, Kiatpathomchai W, Flegel TW: **Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick**. *Mol Cell Probes* 2009, **23**(2):65-70.
149. Andrade TP, Lightner DV: **Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay**. *J Fish Dis* 2009, **32**(11):911-924.
150. Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW: **Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick**. *J Virol Methods* 2008, **154**(1-2):56-60.
151. Ritter C, Dangl JL: **Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events Mediated by Distinct Plant Disease Resistance Genes**. *Plant Cell* 1996, **8**(2):251-257.
152. Jamir Y, Guo M, Oh HS, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, Tang X, Dickman MB, Collmer A, Alfano JR: **Identification of Pseudomonas syringae type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast**. *Plant J* 2004, **37**(4):554-565.
153. Metz M, Dahlbeck D, Morales CQ, Al Sady B, Clark ET, Staskawicz BJ: **The conserved Xanthomonas campestris pv. vesicatoria effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in Nicotiana benthamiana**. *Plant J* 2005, **41**(6):801-814.
154. Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, Hernandez-Guzman G, Bender CL, Pierce NE, Ausubel FM: **Pseudomonas syringae manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(5):1791-1796.
155. Dangl JL, Jones JD: **Plant pathogens and integrated defence responses to infection**. *Nature* 2001, **411**(6839):826-833.
156. Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E *et al*: **A central role of salicylic Acid in plant disease resistance**. *Science* 1994, **266**(5188):1247-1250.
157. Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M: **Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(3):1075-1080.
158. Danese PN, Pratt LA, Kolter R: **Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture**. *J Bacteriol* 2000, **182**(12):3593-3596.
159. Hay ID, Gatland K, Campisano A, Jordens JZ, Rehm BH: **Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid Pseudomonas aeruginosa strain**. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**(18):6022-6025.
160. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I: **Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose**. *Mol Microbiol* 2002, **43**(3):793-808.
161. Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ: **Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates**. *Environ Microbiol* 2006, **8**(11):1997-2011.

162. Jones SM, Yerly J, Hu Y, Ceri H, Martinuzzi R: **Structure of Proteus mirabilis biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media**. *FEMS Microbiol Lett* 2007, **268**(1):16-21.
163. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T: **Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants**. *Mol Microbiol* 2003, **48**(6):1511-1524.
164. Sivan A, Szanto M, Pavlov V: **Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium Rhodococcus ruber**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**(2):346-352.
165. Dunger G, Relling VM, Tondo ML, Barreras M, Ielpi L, Orellano EG, Ottado J: **Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to Xanthomonas epiphytic survival**. *Arch Microbiol* 2007, **188**(2):127-135.
166. Newman MA, Conrads-Strauch J, Scofield G, Daniels MJ, Dow JM: **Defense-related gene induction in Brassica campestris in response to defined mutants of Xanthomonas campestris with altered pathogenicity**. *Mol Plant Microbe Interact* 1994, **7**(5):553-563.