



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesis de Maestría en Biotecnología

**“Efecto de agroquímicos a base de
cobre sobre la bacteria *Xanthomonas
citri* subsp. *citri*, agente causal del
cancro cítrico”**

Paola Russi

Departamento de Biología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientador: Ing. Ag. Mercedes Peyrou, Msc.

Co-orientador: Dra. María Inés Siri

Tribunal: Ing. Ag. Elena Pérez, Msc., Dra. Andrea Villarino y Dra. Lucía Yim.



AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora, Mercedes Peyrou, quien me permitió integrar su línea de trabajo y conocer el mundo de los cítricos y sus patógenos. Siendo mi referente en esta área, pero también dándome las herramientas necesarias para cuestionar y tomar mis propias decisiones.

A mi co-orientadora, María Inés Siri, quien se integró al proyecto de tesis un poco más tarde, pero se involucró totalmente en el mismo, aportando desde otro punto de vista y trabajando activamente para que saliera adelante en tiempo y forma.

A todos los integrantes del grupo "Citrus" que siempre me hicieron sentir como en casa y somos como una pequeña familia: Raquel, Pamela, Mariana, Hector, Luis y Mercedes.

A todos mis compañeros de Biología Molecular del IIBCE, los que están y los que siguieron otro camino, los más grandes y los más chicos,.... los más "viejos" y los más "nuevos",.... compañeros con los que he compartido tardes, conocimiento, materiales, mesada, y unos buenos mates, y que hacen que ir a trabajar sea muy agradable!

A Federico Santiñaque del servicio de citometría, un excelente técnico y una excelente persona, ... gracias a él pudimos obtener muy buenos resultados en poco tiempo.

A mi padre Daniel que siempre me ha apoyado tanto en mi carrera profesional, como en cada uno de mis emprendimientos extracurriculares!!. A mi abuela Nelly, que nunca le quedó muy claro que hago en el trabajo, pero ha estado presente en todo momento. A mis hermanas, Erika y Alejandra, con las cuales sé que puedo contar y a mis sobrinos, Antonella y Joaquín, que son la alegría de la casa.

Un agradecimiento muy especial a mi madre, un ejemplo de vida, que aunque no esté acá visiblemente, sé que está conmigo y seguirá estando siempre....

...y a toda mi familia, mis amigos de la facu, mis afectos, ... mis hermanos del alma, que son los que le dan valor y peso a los pequeños logros y metas que alcanzamos.

Finalmente agradezco a la ANII por la beca de maestría, y al sector productivo por financiar parte del proyecto.

Gracias!!

Contenido

RESUMEN	7
1 - INTRODUCCIÓN	8
1.1 - La citricultura en Uruguay.....	8
1.1.1 - Los cítricos.....	8
1.1.2 - Origen de los cítricos.....	9
1.1.3 - Producción de cítricos en el Uruguay.....	9
1.2 - Cancro cítrico: una enfermedad cuarentenaria.....	10
1.2.1 - Antecedentes de la enfermedad.....	10
1.2.2 - Ciclo de la enfermedad	12
1.2.3 – Síntomas.....	12
1.2.4 - Impacto económico.....	14
1.3 - Xanthomonas spp.....	15
1.4 - Xanthomonas citri subsp. citri: agente causal del cancro cítrico	16
1.4.1 - Características generales	16
1.4.2 -Adaptación y supervivencia epífita de Xcc.....	17
1.4.3 - Sistemas de secreción y su relación con la virulencia.....	18
1.5 - Interacción planta-patógeno.....	22
1.5.1 - Sistema de defensa de la planta	23
1.6 - Bacterias viables no cultivables	24
1.7 - Justificación del trabajo de tesis	25
1.7.1 - Genes seleccionados para el análisis de expresión.....	28
2 - HIPOTESIS DE TRABAJO.....	31
3 - OBJETIVOS	31
3.1 - Objetivo general.....	31
3.2 - Objetivos específicos.....	31
4 - MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 - Condiciones de crecimiento de plantas de cítricos y tratamiento con cobre.....	32
4.1.1 - Condiciones de crecimiento de las plantas cítricas	32
4.1.2 - Tratamiento con cobre.....	33
4.2 – Ensayos de inoculación y extracción de ácidos nucleicos	33
4.2.1 - Mantenimiento y condiciones de crecimiento de la bacteria Xanthomonas citri subsp.citri (Xcc)	33
4.2.2 – Método de inoculación de Xcc en hoja de pomelo	33
4.2.3 - Recuperación de Xcc a partir de plantas cítricas inoculadas (“exudación”).....	34

4.2.4 - Extracción de ADN genómico de Citrus	35
4.2.5 - Extracción de ADN genómico de Xcc	35
4.2.6 - Extracción de ARN de Xcc, tratamiento con DNasa y síntesis del ADNc.....	35
4.3 - Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)	37
4.3.1 - Selección de genes y diseño de cebadores	37
4.3.2 - Especificidad de los cebadores	38
4.3.3 - Evaluación de los cebadores por PCR a tiempo final	38
4.3.4 - Clonado de los genes para la construcción de las curvas estándar	39
4.4 - Análisis de la multiplicación de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.....	42
4.4.1 - Estrategia experimental	42
4.4.2 - Obtención de la curva estándar para la cuantificación absoluta por qPCR.....	44
4.4.3 - Curvas de crecimiento.....	45
4.5 - Análisis de la inducción del estado VBNC de Xcc en plantas de cítricos tratadas Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.	45
4.5.1 - Estrategia experimental	45
4.5.2 - Citometría de flujo	46
4.5.3 - Microscopio confocal	47
4.6 - Análisis de la expresión diferencial de genes de patogenicidad de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua.....	49
4.6.1 - Estrategia experimental	49
4.6.2 - Cuantificación relativa.....	51
4.7 - Determinación de los cambios en la expresión de genes de patogenicidad en células de Xcc que entraron en estado VBNC, luego del tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ mediante ensayos in vitro.	52
4.7.1 - Estrategia experimental	53
4.8 Análisis estadístico.	53
5 - RESULTADOS	54
5.1 - Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)	54
5.1.1 - Especificidad de los cebadores	54
5.1.2 - Evaluación de los cebadores con ADN genómico y ADNc de Xcc	55
5.2 - Análisis de la multiplicación de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.....	56
5.2.1 - Cuantificación de Xcc in planta por crecimiento en medio sólido.....	56
5.2.2 - Cuantificación de Xcc in planta por qPCR	57
5.2.3 - Comparación entre crecimiento en medio sólido y cuantificación absoluta por qPCR para cada tratamiento.....	60

5.3 - Análisis de la inducción del estado VBNC de Xcc en plantas de cítricos tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.	62
5.3.1 - Limitante de la citometría de flujo para la detección y cuantificación de la cepa Xcc-GFP	65
5.3.2 - Controles de la técnica.....	67
5.4 - Expresión diferencial de genes de Xcc relacionados con la patogenicidad de la bacteria en plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua.....	68
5.4.1 - Cálculo de la eficiencia de amplificación.....	68
5.4.2 - Controles de qPCR.....	68
5.4.3 - Análisis de la expresión relativa de genes de patogenicidad de Xcc	70
4.7 - Determinación de los cambios en la expresión de genes de patogenicidad en células de Xcc que entraron en estado VBNC, luego del tratamiento con CuSO ₄ ·H ₂ O, en ensayos in vitro.	73
6 - DISCUSIÓN	75
Efecto del Cu ⁺⁺ sobre la multiplicación de Xcc en planta	75
Inducción del estado VBNC	76
Expresión de genes de patogenicidad en bacterias en contacto con plantas tratadas Nordox3X.....	79
Expresión de genes de patogenicidad en bacterias en contacto con CuSO ₄ in vitro.....	82
7- CONCLUSIONES	85
8 – PERSPECTIVAS	86
9 – BIBLIOGRAFÍA	87
10 - APENDICES	93
APENDICE 1	93
Clonación, transformación y confirmación	93
Extracción de ADN plasmídico y cuantificación	93
APENDICE 2.	95
Cuantificación de Xcc por crecimiento en medio sólido	95
Cuantificación de Xcc por qPCR.....	95
APENDICE 3	101
Controles de citometría.	103
APENDICE 4	104
APÉNDICE 5	111

RESUMEN

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xcc) es la bacteria responsable del cancro de los cítricos, enfermedad que afecta a todas las especies y variedades del género *Citrus*, ocasionando importantes pérdidas económicas. Un control razonable, aunque no óptimo, de la enfermedad se logra en base a productos cúpricos. Con el objetivo de comprender el mecanismo de acción del Cu⁺⁺ se estudió su efecto sobre la multiplicación y la inducción del estado de viable pero no cultivable (VBNC). También se evaluó su efecto sobre la expresión de genes asociados a la patogenicidad de Xcc, tanto en ensayos *in planta*, como *in vitro*. El efecto sobre la multiplicación bacteriana se realizó sobre un grupo de plantines de pomelo tratados con el producto cúprico, Nordox 3X, y otro tratado con agua que fueron posteriormente inoculados con Xcc. La cantidad de bacteria presente en el tejido fue recuperada a diferentes tiempos y evaluada por PCR en tiempo real (qPCR) y crecimiento en medio sólido. La presencia de bacterias VBNC se evaluó por citometría de flujo. La expresión de los genes de patogenicidad *hrpG*, *virK*, *avrXacE1*, *avrBs2*, *hrcR* y *pglA* se cuantificó por qPCR sobre una población de Xcc provenientes de plantas tratadas de la misma forma que los ensayos de multiplicación. Para los ensayos de expresión *in vitro*, las bacterias fueron mantenidas con una concentración de sulfato de cobre equivalente en Cu⁺⁺ a la dosis utilizada en los ensayos *in planta*, induciendo así el estado VBNC. Los resultados de multiplicación muestran un 70% de bacterias muertas en los tratamientos con cobre. Sin embargo, existe una proporción de Xcc (20-25 %) que se mantienen en estado VBNC tanto en células tratadas con agua como con Cu⁺⁺. Los resultados de expresión diferencial entre bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X y no tratadas muestran que en las primeras la expresión del gen *hrpG* disminuye, mientras que la expresión del gen *avrXacE1* aumenta, cuando los otros genes presentan una tendencia que no es estadísticamente significativa. Por otro lado, en el ensayo *in vitro*, la expresión de los genes de patogenicidad disminuye o no se ven afectados en la población de Xcc tratada con sulfato de cobre. Los resultados obtenidos sugieren que el cobre dentro de la planta disminuye la población bacteriana. Por otro lado, también disminuye la expresión del gen *hrpG*, uno de los principales genes reguladores de los procesos de patogenicidad de Xcc y de otras *Xanthomonas*. Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a la comprensión del mecanismo de acción de los compuestos a base de cobre así como de los complejos procesos que intervienen durante la interacción de Xcc con plantas de cítricos.

1 - INTRODUCCIÓN

Las bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas* infectan un amplio rango de hospederos y son responsables de importantes enfermedades de plantas de cultivo. Dentro de este género se encuentra la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, (ex = *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) responsable del cancro cítrico, una de las enfermedades más importantes de la citricultura, ya que puede ocasionar grandes pérdidas económicas.

1.1 - La citricultura en Uruguay

En las últimas cuatro décadas la citricultura desarrolló una trama económica y comercial muy valiosa, que logró posicionar al país como un proveedor de calidad de importantes mercados mundiales, fundamentalmente el europeo, siendo el único rubro de la horti-fruticultura que ha conseguido tener una fuerte inserción en los mercados internacionales en forma sostenida. La citricultura del Uruguay, que se produce a contra-estación del Hemisferio Norte, es conocida y respetada a nivel mundial por buenos estándares de calidad y de cumplimiento comercial (Caputi y Montes, 2010).

1.1.1 - Los cítricos

Las especies con interés comercial de los cítricos pertenecen a la familia de las *Rutaceas*, subfamilia *Aurantioideas*. Esta se encuentra dentro de la división *Embriophyta Siphonogama*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledonae*, subclase *Rosidae*, superorden *Rutanae*, orden *Rutales*, según la clasificación de Swingle 1967. Todas las especies de esta subfamilia son árboles o arbustos de hoja perenne, excepto las del género *Poncirus* (Agustí, 2000).

El género *Citrus* posee 16 especies de hojas perennes. El tamaño y la forma de los árboles pueden variar, desde erecta hasta globosa o desgarbada. Las hojas son unifoliadas de tamaño grande (pomelos), mediano (naranjas y limones) o pequeño (la mayor parte de los mandarinos). Las axilas de la hoja presentan espinas. Las flores se organizan en inflorescencias uni y multiflorales, con o sin hojas, tienen 5 sépalos verdes, 5 pétalos blancos, 20-40 estambres soldados, con polen no siempre fértil, y 8-10 carpelos soldados. En las variedades con semillas, cada uno de ellos alberga entre 4 y 8 óvulos. El fruto está formado por un ovario simple de 8-10 carpelos soldados (segmentos) rodeados por una corteza resistente. Su forma es variable, desde esférica (naranjas) a esférico aplanada (pomelos y mandarinas) u oval (limones). La pulpa está

formada por vesículas, que contienen el zumo, unidas por un filamento vascular a las paredes dorsales de los segmentos. La corteza contiene numerosas glándulas de aceites esenciales y su color varía desde amarillo-verdoso (limas, limones y pomelos) a naranja más o menos rojizo (naranjas y mandarinas). Sus semillas, cuando existen, son ovoides o redondeadas y contienen uno o más embriones (Agusti, 2000).

El género *Citrus* es muy importante desde el punto de vista agronómico. Su cultivo representa la producción de frutos para consumo en fresco y para su transformación en zumo. Las especies de mayor difusión son:

- *Citrus sinensis*(L) Osb Naranja dulce
- *C. reticulata* Blanco. Mandarina
- *C. aurantium* L. Naranjo amargo
- *C. limon* (L.) Burm. Limonero.
- *C. paradisi* Macfad. Pomelo
- *C. grandis* (L.) Osb. Pummelo.
- *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. Lima Mejicana

Actualmente, la clasificación botánica que se utiliza no es uniforme y si bien el criterio de Swingle es el más generalizado, también existe la clasificación de Tanaka, 1977 que se halla plenamente aceptada para algunas especies (Agustí, 2000).

1.1.2 - Origen de los cítricos

El origen de los cítricos (*Citrus* sp.) se localiza en Asia oriental, en una zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia. Actualmente su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44º N y 41ºS (Agustí, 2000).

1.1.3 - Producción de cítricos en el Uruguay

La producción de cítricos en Uruguay representa aproximadamente el 1,1 % del producto bruto agrícola, generando un ingreso de 60 millones de dólares. La producción anual es de 300 mil toneladas, la mitad de la cual se exporta y el resto es destinada al mercado interno donde se consume como fruta fresca o productos procesados (jugos, concentrados, base de pectina, pellet para alimentación animal, entre otros). La característica de la producción cítrica en

Uruguay es el uso intensivo de la mano de obra, principalmente en invierno y primavera, ocupando 10 mil personas en todo el proceso de producción (MGAP-DIEA, 2012).

Podemos diferenciar dos zonas importantes para el cultivo de cítricos en nuestro país. Por un lado la zona norte, de mayor tamaño, abarca los departamentos de Salto, Paysandú, Río Negro y algunas regiones de Rivera. Esta zona abarca el 84 % del área destinada a la citricultura donde predominan naranjas y mandarinas en grandes explotaciones. La segunda zona en importancia es la Sur que tiene como producción principal el cultivo de limón y abarca los departamentos de Soriano, San José, Canelones, Montevideo, Colonia, Maldonado y Florida (MGAP-DIEA, 2012).

La actividad citrícola se lleva a cabo en un área efectiva de 16 mil hectáreas con casi 7.3 millones de plantas y una densidad de plantación promedio de 451 plantas/ha. Las cuatro especies de cítricos más importantes que se producen en nuestro país son naranja, mandarina, limón y pomelo, siendo la naranja la que abarca casi un 50% de la producción (Cuadro 1) (MGAP-DIEA, 2013).

Cuadro 1. Número de plantas de cítricos, superficie y densidad de plantación por especie.

Especie	Existencia (miles de plantas)	Superficie citrícola (ha)	Densidad de plantación (plantas/ha)
Total	7.299	16.174	451
Naranja	3.461	8.130	426
Mandarina	3.024	6.113	495
Limón	751	1.771	424
Pomelo	63	160	394

Fuente: Encuesta Citrícola "Primavera 2013" (MGAP-DIEA)

1.2 - Cancro cítrico: una enfermedad cuarentenaria

1.2.1 - Antecedentes de la enfermedad

El cancro cítrico, causado por la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), es una enfermedad que afecta a todas las especies de cítricos y tiene un impacto económico importante para nuestro país debido, principalmente, a las restricciones cuarentenarias impuestas por los países compradores de nuestra fruta. El cancro cítrico está presente en países productores de cítricos de Asia, islas del océano pacífico e India, América del Sur y el sudeste de los Estados Unidos. En Europa no ha sido reportada la enfermedad, donde se considera la bacteria un organismo cuarentenario (del Campo et al., 2009).

En los Estados Unidos la enfermedad se detectó en la región sureste del país, en 1912. Fue introducida a partir de plantines provenientes de Japón, y se declaró erradicada de Florida y de los estados adyacentes en 1933. En 1986 apareció nuevamente en Florida, siendo declarada erradicada en 1994. Sin embargo, tres años después la enfermedad re-emergió en la misma área (Graham et al., 2004). Desde entonces, la situación de la enfermedad no ha cambiado en los Estados Unidos, siendo el estado de Florida el más afectado.

El cancro cítrico apareció en Brasil en 1957, en un vivero del Estado de San Pablo. Brasil, ostenta hoy el primer lugar en la producción mundial de citrus y las dificultades para el control de esta enfermedad han ocasionado pérdidas millonarias al sector. Desde que fue detectada se ha implementado un riguroso programa para su erradicación. Sin embargo, aún no se ha logrado una completa eliminación, e incluso, se ha dispersado a nuevas regiones de Brasil (de Souza Carvalho et al., 2005).

En Argentina la enfermedad se conoce desde 1928. Si bien no se supo su origen, el agente causal fue identificado como perteneciente al patotipo B. Este tipo de cancro es menos agresivo y el rango de hospederos es más restringido, confinando a las cepas del tipo B a una pequeña área de Argentina. El patotipo B desapareció entre 1978 y 1990, luego de la introducción del patotipo A en 1975. El cancro A es endémico en el noreste Argentino (Canteros, 2004).

En Uruguay el cancro cítrico fue detectado en el año 1949. Los primeros focos fueron hallados sobre limoneros y correspondían al patotipo B. En 1977, la Dirección de Sanidad Vegetal del MGAP inició la Campaña de Prevención y Erradicación del Cancro Cítrico (CPECC) en el Uruguay. En 1979, se detectó un foco de cancro cítrico sobre pomelo en la zona de Salto. Se realizó el aislamiento y caracterización de la bacteria que correspondió al patotipo A o asiático (Canale y Francis, 1988). Desde los años 70 en que se detectó la presencia de la bacteria Xcc, Uruguay llevó adelante una campaña de erradicación, como forma de mantener el status de país libre de esta enfermedad. Para la ejecución de esta campaña se definieron los radios de erradicación correspondientes a los focos donde se encontraba la planta con síntomas, medida que en algunos años afectó duramente la cantidad de árboles en producción y, por lo tanto, la economía del rubro. Paralelamente se llevó adelante, por parte de las instituciones oficiales, un programa de certificación sanitaria de plantas de cítricos, que involucró a la Facultad de Agronomía, al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) con el objetivo de brindar al productor material de propagación de probada calidad sanitaria y evitar así la diseminación de la enfermedad incluso a otras áreas de producción (Arocena et al., 1979). Actualmente ya no se realizan programas de erradicación. A partir de 1999, en acuerdo con los organismos fitosanitarios oficiales de los países compradores de fruta cítrica, se estableció un protocolo de inspección y habilitación de las unidades de

producción para la exportación sustituyéndose de esa manera la erradicación. La trazabilidad realizada a la fruta de exportación permitió mantener el comercio e incluso se logró incorporar a EEUU como importador.

1.2.2 - Ciclo de la enfermedad

La bacteria Xcc se multiplica en las lesiones y, cuando las condiciones de humedad sobre la superficie de la hoja son favorables, se libera desde una matriz extracelular de exopolisacáridos (EPS) que ayuda a su dispersión y supervivencia (Graham et al., 2004). La infección primaria ocurre en las primeras brotaciones de primavera por la dispersión de la bacteria desde lesiones viejas sobre brotes jóvenes. La incidencia del cancro no es severa en árboles maduros. Los cancos de primavera también se pueden desarrollar sobre los márgenes de las lesiones viejas, que son fuente de inóculo para la infección primaria. La infección secundaria ocurre por la propagación del patógeno ocasionado por la lluvia y el viento desde lesiones nuevas (Goto, 1992). La lluvia y el viento son el principal agente de difusión de la bacteria a corta distancia, ayudando en la penetración del patógeno a través de los estomas o heridas hechas por espigas, poda, insectos, tales como el minador de cítricos (*Phyllocnistis citrella*), o daño mecánico debido a la maquinaria de agricultura. El principal factor de dispersión a larga distancia es a través del traslado de material vegetal enfermo efectuado por el hombre. La bacteria puede sobrevivir en zonas adyacentes de lesiones viejas hasta la siguiente estación de crecimiento (Graham et al., 2004). También se ha detectado bacteria en tejido asintomático, sugiriendo que puede existir de forma latente en el material vegetal durante un tiempo aún no determinado (Zhong-kang et al., 2004).

1.2.3 – Síntomas

La bacteria entra a la planta a través de los estomas¹ (figura 1) o heridas y se multiplica en los espacios intercelulares del mesófilo² induciendo hipertrofia (alargamiento celular), hiperplasia (división celular) y muerte celular (necrosis) (Duan et al., 1999). Las hojas de cítricos son susceptibles durante un corto período de tiempo, correspondiente a la etapa de máximo crecimiento (dos o tres semanas de edad). Los primeros síntomas son pequeñas lesiones tipo pústulas que aparecen alrededor del noveno día luego de la infección. Con el tiempo, las lesiones

¹ Los estomas son poros situados en la superficie foliar que permiten el intercambio de gases.

² Tejido vegetal, también denominado tejido parenquimático, cuyas células tienen una pared celular flexible y delgada. En hojas participan en la fotosíntesis (mesófilo), en raíces y tallo funcionan principalmente en el almacenamiento de almidón y sacarosa.

se vuelven marrones con un margen de “water-soaked” (aumento localizado de agua), frecuentemente rodeadas por un halo clorótico. El “water soaking” es uno de los primeros síntomas macroscópicos observados (Brunings y Gabriel, 2003). Las pústulas comienzan a elevarse tomando un aspecto esponjoso y son visibles en ambos lados de la hoja (figura 2). El fruto atacado presenta pústulas que irrumpen en la cutícula y se convierten en canchales oscuros, y a pesar de no afectar más allá del flavedo³ de la fruta, desmejoran su aspecto con la consiguiente depreciación del producto. El período de susceptibilidad del fruto es mayor que el de hoja requiriendo repetidos tratamientos de control durante la estación de crecimiento del mismo. Los síntomas en ramas son similares a los del fruto y hoja (figura 3) (López, 2000; Graham et al., 2004; Das, 2003).

Figura 1. Microscopía electrónica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en un estoma de la superficie abaxial de hoja de pomelo. Fuente: Graham et al., 2004.



³ El flavedo (o exocarpo) es la capa más externa del pericarpo o fruto.



Figura 2. Vista de las lesiones de cancro en la cara superior de la hoja (izquierda) y en la cara inferior (derecha). Fuente: Schubert v Sun, 2003

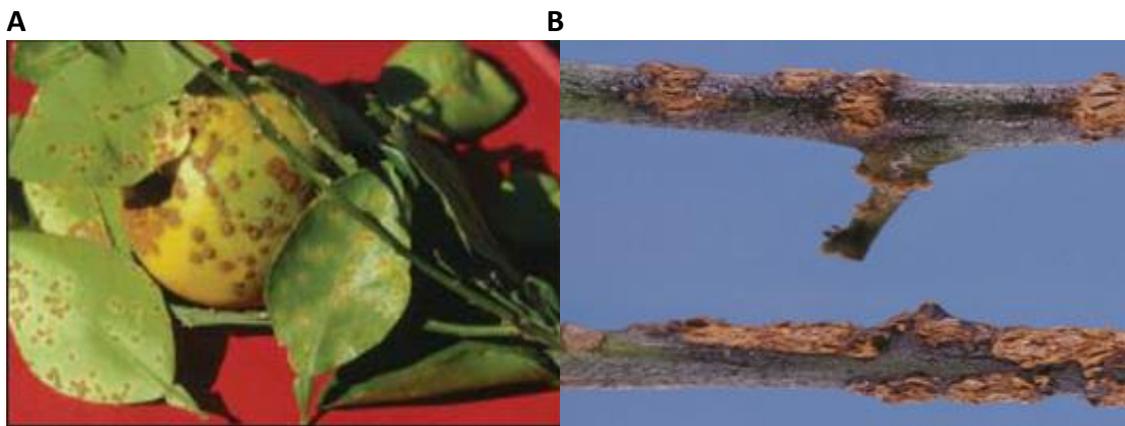


Figura 3. Síntomas de cancro presentes en hoja y frutos (A) y tallos (B) de pomelo (Schubert y Sun, 2003).

1.2.4 - Impacto económico

Uno de los problemas más importantes que sufrió el sector, con consecuencias en la forma de trabajo y en las relaciones entre el sector privado y el sector público, fue la irrupción del cancro cítrico a mediados de la década del ochenta, lo cual ocasionó pérdidas económicas importantes debido a las restricciones cuarentenarias (Caputi y Montes, 2010). Si bien con el tiempo se logró una cierta flexibilidad táctica para convivir con el problema (desde una óptica de acceso a mercados), es evidente que este problema erosionó la dinámica y el funcionamiento de la citricultura en Uruguay. Las plagas cuarentenarias⁴, como el cancro cítrico, son un capítulo primordial para una citricultura exportadora. La definición precisa de programas tanto de prevención como de vigilancia y control, con sus respectivos recursos y articulaciones de todos

⁴ Plaga de importancia económica potencial para el área en peligro, o si existe, no está extendida y se encuentra bajo control oficial.

los organismos que intervienen de una manera u otra son fundamentales (Caputi y Montes, 2010).

Por otro lado, cabe destacar el problema ocasionado por el uso de agroquímicos para su control debido a la acumulación de residuos en fruta de consumo y la fitotoxicidad expresada en un manchado de la fruta que también contribuye a su depreciación. También se debe agregar el gasto económico ocasionado por el costo de estos agroquímicos. Además, las crecientes restricciones en cuanto al número de principios activos que se pueden utilizar en los programas de control fitosanitario, los umbrales cada vez menores de los LMR (Límites Máximos de Residuos), las mayores exigencias de algunos países o supermercados en cuanto a tener sus propias normas para residuos admitidos (por ejemplo Alemania), indican que se va hacia un camino de pocas sustancias activas a utilizarse de modo de ofrecer a los consumidores productos prácticamente libres de residuos (Caputi y Montes, 2010).

A las pérdidas ocasionadas por los factores descritos, debemos agregarle el daño directo provocado por la defoliación, daño y caída prematura del fruto, secado de ramas y debilitación general del árbol. A menudo, casi todos los frutos y hojas de árboles jóvenes y susceptibles se infectan, pudiendo demorar años su recuperación en árboles severamente afectados (Graham et al., 2004).

1.3 - *Xanthomonas spp.*

Las bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas spp.* son bacterias Gram-negativas, con forma de bastón. La mayoría de ellas poseen un pigmento amarillo insoluble en agua, la xanthomonadina, del cual proviene su nombre (figura 4). Estos pigmentos amarillos son compuestos aril polienos bromados, que están asociados a la membrana externa de la pared celular. Participan en la protección de la bacteria frente a la luz UV y desecación, permitiendo la adaptación y supervivencia sobre la superficie de la hoja. Debido a que otras bacterias amarillas no producen xanthomonadina el análisis de este pigmento proporciona un medio simple y fiable para la identificación y diferenciación de bacterias amarillas Gram-negativas. Estudios comparativos de la xanthomonadina mostró que todos los pigmentos producidos por cepas del género *Xanthomonas* presentan un espectro de absorción característico y propiedades cromatográficas similares (Goto, 1992).

Los fitopatógenos del género *Xanthomonas* invaden un amplio rango de hospederos y tienen altos niveles de especificidad de raza. Son patógenos que siempre están asociados a las plantas, ninguno son de vida libre o de suelo y casi todos crecen de forma endófito. Aunque el género, en sí mismo, tiene un amplio rango de hospederos que incluyen 68 familias de plantas y más de 240 géneros (Brunings y Gabriel, 2003), una cepa determinada está limitada a un grupo de hospederos específicos, o a un grupo de especies dentro de un género. Esto hace que *Xanthomonas* sea un género ideal para los estudios de interacciones específicas entre la planta y el patógeno. En la nomenclatura y taxonomía de *Xanthomonas*, el grupo de especie de plantas que sirven como hospederos, usualmente, está indicado por el estatus de “patovar”, y ya se han descrito alrededor de 140 patovares diferentes dentro del género (Brunings y Gabriel, 2003). Sin embargo, dentro de las *Xanthomonas* patógenas de citrus la nomenclatura ha sido modificada, eliminándose el término patovar y sustituyéndose por subespecie (Schaad et al., 2006).

1.4 - *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: agente causal del cancro cítrico

El cancro cítrico es causado por dos grupos filogenéticamente distintos de cepas del género *Xanthomonas*: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) (denominada anteriormente *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) y *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (denominada anteriormente *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) (Schaad et al., 2006). Xcc es la responsable de la forma más severa del cancro cítrico. Dentro de este grupo se encuentra el patotipo A, o asiático. Este patotipo A es el más virulento, afectando un amplio rango de hospederos (Brunings y Gabriel, 2003). Se han detectado nuevas cepas que están relacionadas con el patotipo A. La cepa A* fue identificada en el sudoeste de Asia y afecta lima mexicana (Vernière et al., 1998) y la cepa A^w, aislada en Florida, afecta lima mexicana y “alemow” (*Citrus macrophylla*) (Cubero y Graham, 2002).

En el grupo *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* se encuentran los patotipos B y C. El patotipo B, originario de América del Sur, afecta principalmente limón (*Citrus limon*). Este patotipo se ha encontrado en Argentina, Uruguay y Paraguay, y se piensa que ha sido desplazado por el patotipo asiático que es más virulento. El patotipo C ha sido aislado en pequeñas áreas de San Pablo (Brasil) y afecta lima mexicana (*Citrus aurantifolii*) (Shubert et al., 2001).

1.4.1 - Características generales

Xcc es una bacteria Gram-negativa en forma de bastón y con un flagelo polar, cuyo tamaño es de aproximadamente 1.5-2.0 x 0.5-0.75 μm . Su crecimiento es aerobio obligado. En medio de cultivo, las colonias son usualmente amarillas como resultado de la producción del pigmento xanthomonadina (figura 4). La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 28°C - 30°C, y el rango máximo de temperatura es de 35 - 39°C. Las células bacterianas son positivas para la hidrólisis de almidón, esculina, caseína, licuefacción de gelatina, y producción de tirosinasa, catalasa, de sustancias reductoras a partir de sacarosa, y sulfuro de hidrógeno. La bacteria es negativa para la reducción de nitrato, producción de indol y para el test rojo de metilo⁵ (Das, 2003).

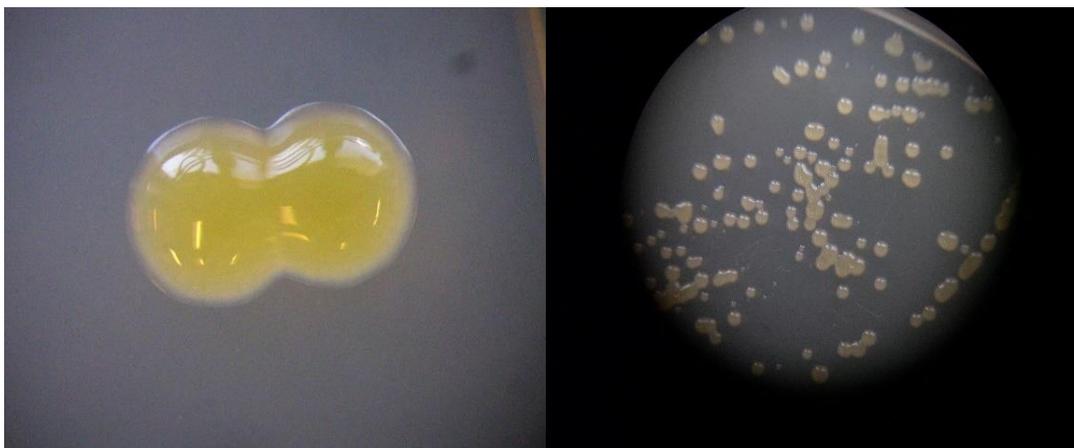


Figura 4. Colonias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* crecidas en caldo nutritivo agar

1.4.2 -Adaptación y supervivencia epífita de Xcc

Se considera que Xcc, antes de entrar al tejido vegetal, se encuentra de forma epífita sobre la superficie de la misma. Para prolongar la supervivencia y colonización la bacteria forma biofilms por producción de exopolisacaridos (EPS), xanthano (sintetizado por el operon *gum*) (Dunger et al., 2007) y la hemaglutinina filamentosa, FhaB (Gottig et al., 2009). Los biofilms son comunidades bacterianas en la cual las células están embebidas en una matriz extracelular de compuestos poliméricos adheridos a la superficie. La vida en el biofilm ayuda a proteger a la bacteria de condiciones deletéreas. Además, la formación de biofilm parece ser un factor importante en el ciclo de la enfermedad de patógenos bacterianos, tanto animales como en plantas (Bogino et al., 2013).

Rigano et al. (2007) mostró que la formación de biofilm es necesaria para la adaptación epífita y el desarrollo del cancro cítrico por Xcc. Una vez colonizado el tejido, la bacteria podría inyectar

⁵ El rojo de metilo es un indicador de pH. Permite determinar la formación de ácidos que se producen durante la fermentación de un carbohidrato. Una reacción positiva indica que el microorganismo realiza una fermentación de la glucosa por la vía ácido mixta.

efectores de patogenicidad dentro de la célula vegetal a través del sistema de secreción tipo III, modulando el mecanismo de defensa de la planta (Dunger et al., 2005; Guo et al., 2011).

Además del xanthano y la proteína filamentosa FhaB, otros factores cumplen un rol importante en la colonización del hospedero y formación de biofilm, entre los que se encuentra el sistema de dos componentes ColS/ColR (Yang y Wang, 2011), adhesinas tipo filamentosas, flagelina, UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, lipopolisacáridos (LPS) sintetizados por *wxacO* y *rbfC* (Li y Wang, 2011), el sistema de dos componentes RbfS (Li y Wang, 2011b), entre otros (Huang et al., 2013).

1.4.3 - Sistemas de secreción y su relación con la virulencia

Los sistemas de secreción bacterianos son importantes para la interacción del patógeno con el hospedero. A través de ellos se liberan factores de virulencia al ambiente bacteriano o dentro de la célula vegetal, necesarios para la colonización del tejido y el desarrollo de la enfermedad. Hasta el momento se han descrito ocho sistemas de secreción en bacterias gram-negativas (Saier, 2006), cinco de ellos presentes en Xcc. El sistema de secreción tipo I está involucrado en la liberación de toxinas y de una variedad de compuestos. El sistema de secreción tipo II (SST2) secreta factores de virulencia incluyendo enzimas con actividad degradadora de pared celular, entre las que se encuentran proteasas, amilasas, pectato liasas, celulasas y xilenasas. Xcc posee un sistema de secreción tipo I y dos sistemas de secreción tipo II (Baptista et al., 2010; Szczesny et al., 2010). Se observó que mutaciones en los genes *xps* de Xcc, pertenecientes al SST2, provoca un retardo en el desarrollo de los síntomas en pomelo (Yan y Wang, 2012).

El sistema de secreción tipo III (SST3) está muy conservado entre patógenos de plantas y animales, y participa en la liberación de proteínas efectoras, denominadas efectores tipo III, desde el citoplasma bacteriano hacia el interior de la célula hospedera. Estas proteínas efectoras pueden actuar como factores de virulencia, interfiriendo con una variedad de funciones de la planta que promueven la enfermedad, siendo esencial para la patogenicidad del género *Xanthomonas*. Por otro lado, algunas proteínas efectoras, denominadas proteínas de avirulencia, son reconocidas por la planta y desencadenan una respuesta de defensa (Kay y Bonas, 2009). Aunque las cepas de *Xanthomonas* spp. secretan 15 o más proteínas efectoras tipo III, solo para unas pocas de estas proteínas se ha determinado su rol en la virulencia de la bacteria. Por ejemplo, la proteína AvrBs2 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* contribuye a la multiplicación de la bacteria en la planta, el desarrollo de síntomas y la sobrevivencia epífita (Kay y Bonas, 2009). En la bacteria Xcc hay solo un SST3 (Moreira, et al., 2004). Un efector tipo III muy caracterizado en Xcc es la proteína PthA, el cual se describe más adelante. Se observó que

mutantes de Xcc en este gen no desarrollan los síntomas característicos de cancro, provocando una clorosis⁶ en las hojas (Yan y Wang, 2012).

El sistema de secreción tipo IV (SST4) está involucrado en el transporte de macromoléculas desde el citoplasma bacteriano al interior de la célula vegetal. Xcc tiene un grupo de genes similar a los del sistema de secreción tipo IV de *Bordetella pertussis* el cual está involucrado en la secreción de la toxina de pertussis (Fronzes et al, 2009).

Xcc también contiene genes que codifican para adhesinas que se asocian a superficies y parecen ser autotransportadores del sistema de secreción tipo V. Estas adhesinas tendrían un rol no solo en la adhesión a superficies bióticas, sino también en la formación del biofilm (Kay y Bonas, 2009).

1.4.3.1 - Sistema de secreción tipo III

Para las bacterias fitopatógenas Gram-negativas, el sistema de secreción tipo III (SST3) es fundamental en la interacción planta-patógeno. Debido a que el SST3 es requerido para la patogenicidad, o para la inducción de una rápida respuesta de resistencia en la planta, los genes que codifican dicho sistema y proteínas relacionadas se denominan genes de respuesta hipersensitiva y patogenicidad (*hrp*, “*hypersensitive response and pathogenicity*”). El operón *hrp* de Xcc está compuesto por 25 genes que se extienden desde *hpa2* a *hpaF* (Figura 5). De los 25 genes, 9 pertenecen a un grupo de genes conservados en plantas y animales, denominados *hrc* (*hrp-conserved*), y constituyen el core del traslocón del sistema SST3. En *X. campestris* pv. *vesicatoria* las regiones que flanquean el cluster *hrp* contienen secuencias de inserción, genes para una transposasa y un ARNt, sugiriendo que este cluster es parte de una isla de patogenicidad (Dunger et al., 2005).

En *Xanthomonas* spp. los genes *hrp* están regulados por un activador tipo AraC denominado HrpX, el cual a su vez se encuentra bajo el control de la proteína HrpG, un regulador de la familia OmpR (Yamazaki, 2008., Astua-Monge et al. 2000). Los reguladores positivos OmpR son proteínas de unión al ADN que aumentan la actividad de la ARN polimerasa. Mutantes del gen *hrpG* no genera síntomas de cancro (Cappelletti, 2010). Algunos genes regulados por HrpX poseen una secuencia consenso en las regiones promotoras denominada promotor inducible en planta (PIPbox, “*plant-inducible promoter*”) (Guo et al., 2011, da Silva et al., 2002). HrpG activa

⁶ Condición fisiológica anormal en la que el follaje produce insuficiente clorofila. Cuando esto ocurre las hojas no tienen la coloración normal verde; la coloración es de un verde pálido, amarillo o amarillo blanquecina.

la expresión de los genes *hrcC* y *hrpX* (Guo 2011, Huang, 2009). Los genes *hrpG* y *hrpX* no pertenecen al cluster *hrp* (da Silva et al., 2002).

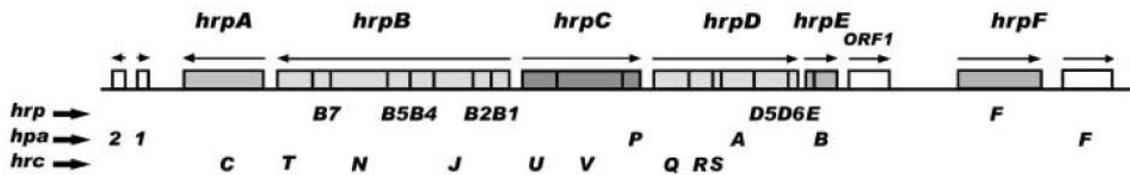


Figura 5. Organización genética del cluster *hrp* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Este esquema fue construido basado en la secuencia del genoma de la cepa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306. Las cajas grises corresponden a ORFs. Las flechas indican la orientación de los operones. También se indican los genes *hrp*, *hpa* y *hrc*. (Dunger et al., 2005).

Estudios recientes mostraron que algunos sustratos del sistema de secreción tipo II (SST2) también están bajo el control de HrpG o HrpX, como es el caso de las proteínas PglA y Virk (Yamazaki et al., 2008). La co-regulación de los sistemas SST3 y SST2 permite a la bacteria superar la defensa de la planta y adquirir nutrientes para su crecimiento (Figura 6). El regulón HrpG/HrpX también está implicado en la regulación de genes relacionados con otros procesos de adaptación y supervivencia, tales como procesos de quimiotaxis, biosíntesis flagelar, transporte, quorum sensing (QS), entre otros (Guo et al., 2011).

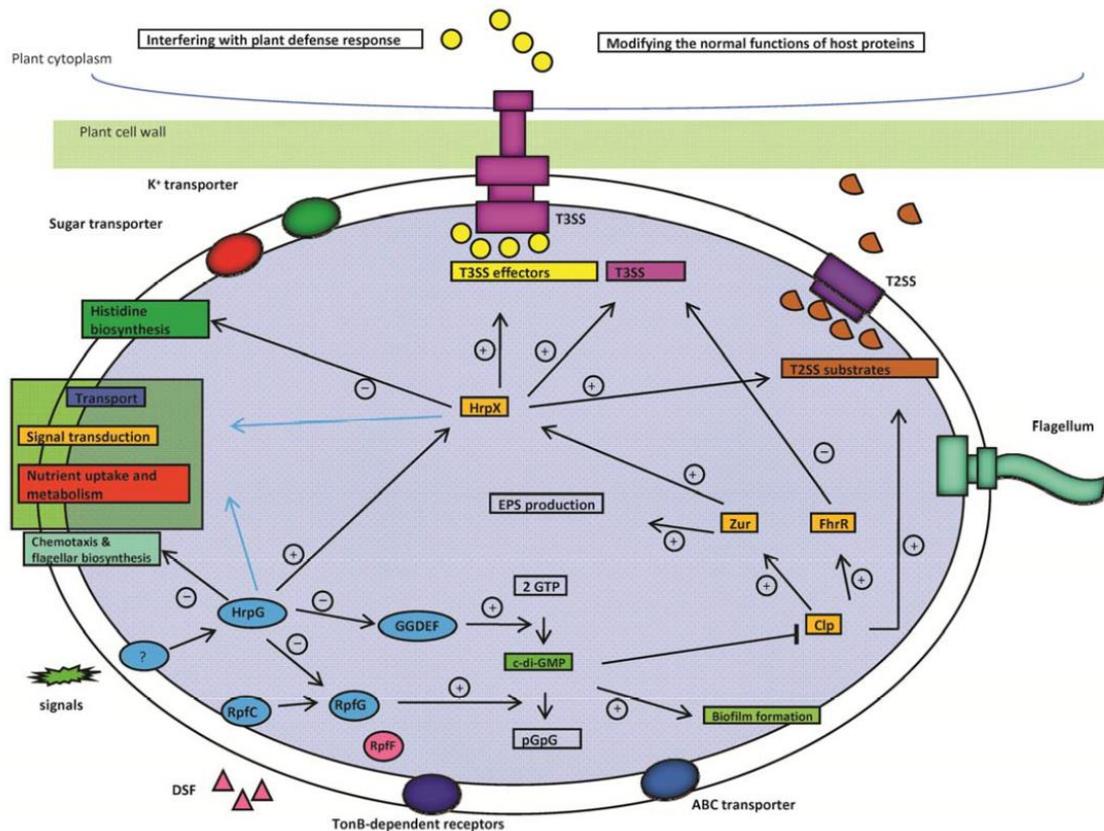


Figura 6: Modelo esquemático de la cascada de regulación de los regulones HrpG y HrpX en el género *Xanthomonas*. El ambiente o señales de la planta activan alguna proteína censora la cual transmite la señal al regulador principal HrpG. El HrpG activado está involucrado en cuatro aspectos principales de la cascada regulatoria: 1) inducción de la transcripción de HrpX, el cual activa la expresión de un gran set de genes de virulencia, tales como T3SS, efectores T3SS, y sustratos del T2SS. HrpX reprime la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de histidina. Durante este proceso, HrpX también regula la transcripción de algunos genes involucrados en la transducción de señales y regulación, tales como factores de transcripción, como también transporte, el cual podría resultar en un cambio en la captura de nutrientes y metabolismo energético; 2) HrpG reprime la transcripción de genes involucrados en quimiotaxis y biosíntesis flagelar con el fin de inhibir la motilidad bacteriana en la fase estacionaria temprana de crecimiento; 3) HrpG también controla la expresión de genes relacionados con la transducción de señales y regulación, transporte y metabolismo general; 4) HrpG interactúa (cross-talk) con el quorum sensing mediado por DSF por medio de la represión de la transcripción de RpfC y de proteínas GGDEF en la fase estacionaria temprana de crecimiento. Estas proteínas contribuyen a la concentración del mensajero cíclico-di-GMP. Altos niveles de c-di-GMP promueve la formación de biofilm, mientras que bajos niveles promueven motilidad y factores de virulencia. Un blanco importante de c-di-GMP es Clp (*cAMP receptor protein-like-protein*), el cual es un activador transcripcional. C-di-GMP se une a Clp para prevenir que este se una al ADN e impedir la expresión de genes que codifican para enzimas extracelulares, y genes involucrados en T3SS y biosíntesis de EPS. Dos factores transcripcionales, FhrR y Zur están bajo el control de Clp y tienen un efecto regulatorio sobre la expresión de los genes *hrp* (Guo et al., 2011).

1.4.3.2 - Efectores tipo III: PthA

Dentro de los genes efectores tipo III implicados en la virulencia de Xcc, el gen de avirulencia *pthA* es el más caracterizado. Es responsable de la hipertrofia, hiperplasia y muerte celular provocadas en la planta hospedera. Se ha observado que los síntomas generados por la expresión de dicho gen se manifiestan solamente en cítricos, ya que en ensayos de expresión transitoria de PthA en plantas de tabaco, frijol, álamo y algodón genera una respuesta de defensa de la planta, denominada respuesta hipersensitiva (Duan et al., 1999). Existen varios alelos en cada cepa y están presentes en todas las *Xanthomonas* que producen cancro (Swarup et al., 1992; Cubero y Graham, 2002).

La proteína PthA producida por Xcc es liberada al interior de la célula vegetal a través del SST3, proceso que involucra un contacto estrecho entre la bacteria y las células del mesófilo del hospedero. Esta proteína es miembro de la familia de proteínas AvrBs3/PthA, ampliamente distribuida en el género *Xanthomonas* (Brunings y Gabriel, 2003). Estas proteínas contienen una estructura particular con 15 a 30 repetidos de 34 aminoácidos en su porción central, un motivo cremallera de leucina, señales de localización nuclear (NLS) y un dominio activador de la transcripción en el extremo C terminal. El número exacto y el re-arreglo de las unidades repetidas difieren y contribuyen a la función y especificidad durante la inducción de resistencia o generación virulencia. Las regiones repetidas median la unión directa al ADN (Kay et al. 2007), permitiendo la transcripción de la planta (Kay y Bonas 2009; Dominguez, et al., 2010).

Si bien el *pthA* es un gen fundamental en la patogenicidad de Xcc, no ha mostrado un perfil de expresión diferente en medio XVM2 (medio sintético que simula el ambiente de la planta) (Astua-Monge, 2005), en presencia de extracto vegetal ni en planta (Mehta y Rosato, 2005). Además, la generación de mutantes en dicho gen y estudios de funcionalidad son complicados debido a la presencia de 4 alelos del *pthA* (*pthA1-4*) cada uno con una secuencia diferente, y a la ubicación de estos en plásmidos (da Silva et al., 2002). La probabilidad de mutación de un gen presente en un plásmido es mucho menor en relación a la probabilidad de mutación de un gen cromosómico (Laia et al., 2009).

1.5 - Interacción planta-patógeno

Las plantas son hospederos de una variedad de fitopatógenos, entre los que se encuentran virus, bacterias, hongos y nematodos. Dependiendo del patógeno específico, estos pueden crecer sobre la superficie de la planta, entre las células de la planta (apoplasto) o dentro del sistema vascular (Kunkel y Chen, 2006). La generación de enfermedad dependerá del tipo de interacción

que se dé entre el patógeno y el hospedero. Por un lado, el fitopatógeno prolifera en el tejido vegetal y obtiene nutrientes de la planta. Por otro lado, la planta se defiende del patógeno a través de diferentes estrategias que limitan la actividad del mismo y la colonización del tejido vegetal.

1.5.1 - Sistema de defensa de la planta

Durante la evolución, las plantas han desarrollado un elaborado sistema de defensa que se denomina inmunidad innata. Dos niveles de la inmunidad innata de la planta han sido muy estudiados: la inmunidad disparada por PAMPs (*PAMP-triggered immunity*) o PTI, y la inmunidad disparada por efectores (*effector-triggered immunity*) o ETI. La PTI es inducida por la percepción de diferentes PAMPs ("*pathogen-associated molecular patterns*") a través de receptores que reconocen patrones específicos (PRRs, "*pattern-recognition receptors*"). Este nivel es referido como la defensa basal que involucra la activación de cascadas de fosforilación, activación transcripcional, producción de especies reactivas del oxígeno, deposición de calosa, cierre de las estomas, etc. La ETI es una respuesta más rápida y amplificada, activada por proteínas intracelulares de resistencia (proteínas R) presentes en las plantas. En interacciones incompatibles se induce una respuesta de muerte celular hipersensible (HR, "*hypersensitive response*") en el sitio de infección. Un patógeno eficiente, luego de superar múltiples obstáculos, tales como la superficie del tejido vegetal y la pared celular, llega al apoplasto y se multiplica para obtener suficientes nutrientes del espacio intracelular. Este proceso dependerá de la habilidad del patógeno para suprimir la inmunidad de la planta y promover la patogénesis por medio de la inyección de proteínas específicas dentro de la célula vegetal. Las proteínas efectoras pueden suprimir tanto la inmunidad PTI como la ETI. Este diálogo dinámico entre plantas y patógenos, va evolucionando o cambiando con el tiempo, generándose nuevos efectores por parte de los patógenos para obtener nuevas funciones de virulencia. Mientras tanto, las plantas evolucionan en nuevos mecanismos de resistencia en respuesta a la evolución de los patógenos. Un modelo de evolución en "zig-zag" dilucidado por Jones y Dangl refiere al proceso de la interacción planta-patógeno (Hou et al., 2009) (figura 7).

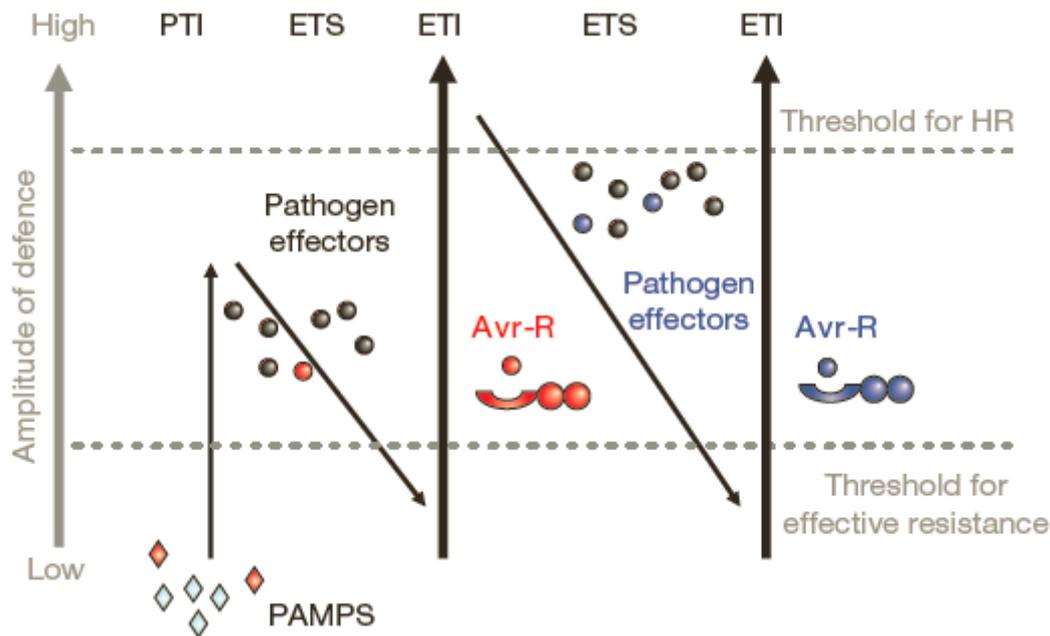


Figura 7. Modelo zigzag que ilustra la evolución del sistema inmune de la plantas. En la fase 1 la planta detecta patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) a través de receptores específicos (PRR), desencadenando una respuesta PTI (*PAMPs- triggered immunity*). En la fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que interfieren con la PTI, induciendo un estado de ETS (*effector triggered susceptibility*). En la fase 3, un efector liberado por el patógeno (indicado en rojo) es reconocido por una proteína R y desencadena la ETI (*Effector-triggered immunity*), una versión amplificada de la PTI que generalmente lleva al desarrollo de la respuesta hipersensible (HR). En la fase 4, algunos patógenos son seleccionados por la pérdida del efector específico (rojo), mientras que adquieren otros efectores nuevos a través de la transferencia horizontal de genes (indicados en azul). Estos pueden ayudar al patógeno a suprimir la ETI. La selección favorece el surgimiento de nuevas proteínas R que pueden reconocer los nuevos efectores adquiridos, desencadenando nuevamente una ETI (Jonas y Dangl, 2006).

1.6 - Bacterias viables no cultivables

Las bacterias que se encuentran en el estado de viable pero no cultivable (VBNC, "*Viable but nonculturable*") son bacterias que pierden la capacidad de crecer en medios nutritivos utilizados en microbiología en los cuales crecen normalmente. Muchos investigadores creen que este estado es una estrategia de supervivencia en respuesta a condiciones ambientales severas, sin embargo, no está claro si las VBNC constituyen un reservorio importante de patógenos en el ambiente. La lista de bacterias patógenas que adoptan este estado como un medio de supervivencia incluye patógenos humanos, patógenos animales (Oliver, 2010), y fitopatógenos (del Campo et al., 2009 y Ordax et al., 2009).

Varios factores químicos y ambientales han sido reportados como inductores del estado VBNC. Entre ellos se encuentra la falta de nutrientes, crecimiento a temperaturas no óptimas, concentración osmótica altas o bajas, concentración de oxígeno, conservantes, metales pesados y la exposición a la luz blanca (Oliver, 2010). Uno de los factores que juegan un rol importante en la inducción del estado VBNC es el peróxido de hidrógeno, H₂O₂, y se observó que la expresión del gen *katG* está implicado en la resucitación de la bacteria (Oliver, 2010).

Algunas características que presentan estas bacterias son, reducción del tamaño, decrecimiento en la síntesis de macromoléculas y disminución de la tasa respiratoria, mientras que los plásmidos son retenidos y los niveles de ATP y potencial de membrana permanecen altos. También se ha reportado que retienen la captura e incorporación de aminoácidos, tienen altos niveles de ARNr, hay cambios en los ácidos grasos de membrana y, en algunas bacterias, se observan cambios en los perfiles proteicos (Oliver, 2010).

Por otro lado, si bien los patógenos no son capaces de iniciar enfermedad cuando están en el estado VBNC, estos retienen la virulencia y la infección puede ser iniciada luego de su reactivación (Sun et al., 2008; del Campo et al., 2009; Oliver, 2010). También se constató que bacterias que se encuentran en este estado continúan con la expresión de determinados genes. Por ejemplo, células de *E. coli* no cultivables expresan una variedad de genes, entre los que se encuentran *mobA*, *rfbE*, *stx1* y aquellos para la síntesis del ARNr 16s (Yaron y Matthews, 2002). En un trabajo de Vora et al., 2005, especies de *Vibrio* sp. que se encuentran en estado VBNC expresan toxinas (*crxAB*, *rtxA*, *hlyA*, *tl*, *tdh* y *vvhA*) y genes de virulencia (*tcpA* y genes del SST3). Estos datos proporcionan evidencias que no solamente las bacterias entran y persisten en el estado VBNC en el ambiente, sino que probablemente permanezcan infecciosas.

Una consecuencia interesante del estado VBNC es la resistencia a antibióticos, los cuales son efectivos en células metabólicamente activas, mientras que en las células VBNC que tienen una actividad metabólica baja las bacterias se vuelven resistentes a estos compuestos (del Mar Lleo 2007; Oliver, 2010).

La reversión del estado VBNC puede lograrse volviendo a condiciones de crecimiento adecuadas para la bacteria, como puede ser, temperaturas óptimas, o en la interacción con su organismo hospedero (del Campo et al., 2009).

1.7 - Justificación del trabajo de tesis

El control del cancro cítrico a nivel nacional e internacional se basa en un manejo integrado de la enfermedad, el cual implica la prevención de la introducción de la enfermedad a través de

material de propagación o frutos, remoción de árboles infestados, utilización de cortinas rompevientos, control biológico y/o químico del minador de cítricos, entre otros. Sin embargo, es fundamental la aplicación de productos a base de cobre sobre el follaje para el control del cancro. Las formulaciones de cobre también son utilizadas en otras enfermedades de cítricos (Schuttle et al., 1997), y en otros cultivos hortícolas (Conover y Gerhold, 1981; Jardine y Stephens, 1987), provocadas tanto por bacterias como por hongos.

A pesar de que en muchas de estas enfermedades se logra un control razonable con los productos cúpricos, el uso de éstos presentan varias limitaciones como son fitotoxicidad en órganos aéreos (Schuttle et al., 1997) (figura 8), acumulación de cobre en el suelo (Alva et al., 1995) y presión de selección de poblaciones de Xcc y otras bacterias resistentes a cobre (Marco y Stall, 1983; Rinaldi y Leite, 2000, Canteros, 1999). Se sabe que iones metálicos a concentraciones trazas son vitales en muchos procesos biológicos, tales como transcripción, respiración y crecimiento. Sin embargo, el aumento de su concentración puede ser tóxico en los procesos celulares. En fitopatógenos, el uso excesivo de compuestos cúpricos puede inducir mecanismos de resistencia, los cuales son de gran interés ya que estos compuestos han sido ampliamente utilizados por más de 20 años en agricultura para el control de las enfermedades. En el genoma de Xcc dos genes cromosómicos codifican homólogos de las proteínas CopA y CopB de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, las cuales participan en la resistencia al cobre. En Xcc, los productos del operón *copAB* juegan un rol importante en los mecanismos de homeostasis del cobre. En mutantes *copAB* de Xcc, en contacto con diferentes concentraciones de CuSO_4 , y posteriormente inoculadas en hojas de limón mostraron un retraso en la aparición de síntomas, o ausencia de síntomas (Texeira et al., 2008). Sin embargo, este operón presente en el cromosoma estaría involucrado en el metabolismo del cobre, pero no en la resistencia de la bacteria frente al metal (Behlau et al., 2011). El desarrollo de cepas resistentes ha sido solamente reportado en Argentina en la cepa Xcc A44 y los determinantes de resistencia fueron ubicados en plásmidos (Canteros, 1999; Behlau et al., 2011). En nuestro país, no se han reportado cepas resistentes al metal, sin embargo, es de importancia monitorear la aparición de resistencias. Este inconveniente, junto con la acumulación en suelo y fitotoxicidad, lleva a la necesidad de reducir las aplicaciones de cobre en los cultivos.



Figura 8: Daño en los órganos aéreos generados por la utilización de agroquímicos a base de cobre.

Actualmente, el único mecanismo propuesto de acción del ión Cu^{++} sobre el control del cancro cítrico se basa en su efecto bactericida sobre la población bacteriana en la superficie de la hoja (Leite et al., 1987; Graham et al., 2004, Canteros, 2004; Schubert y Sun, 2003; Goto, 1992). Sin embargo, resultados obtenidos en el IIBCE, así como por otros investigadores, indican que otros mecanismos podrían estar actuando, ya que se ha observado que el contacto directo de Xcc con concentraciones de cobre similares a las de uso en el campo no elimina totalmente la población bacteriana en tiempos cortos (Stall et al, 2002). Estos resultados estarían demostrando que el efecto del cobre directamente sobre Xcc no sería lo suficientemente drástico como para explicar el control a campo de la enfermedad.

Por otra parte, en un trabajo realizado en el laboratorio de Biología Molecular del IIBCE se observó que una población de Xcc de 10^6 ufc/ml tratadas con una concentración de CuSO_4 , correspondiente a 3 veces la dosis de campo, entran en estado de viable pero no cultivable (VBNC). Sin embargo, un porcentaje de las bacterias no pierden la virulencia cuando son inoculadas en plantas de pomelo (del Campo et al., 2009). Este estado también fue inducido por cobre en *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum* (Alexander et al., 1999) y en *Erwinia amylovora* (Ordax et al., 2010). El estado de no culturabilidad inducido por Cu^{++} podría estar sobrestimando el efecto tóxico del mismo sobre la bacteria, cuando las evaluaciones se realizan mediante el crecimiento en medio de cultivo. Estos resultados sugieren que existen otros mecanismos de acción del cobre, distintos a la acción bactericida hasta ahora propuesta, que podrían estar actuando en combinación para lograr un buen control de la enfermedad.

Los síntomas inducidos por bacterias fitopatógenas, generalmente corresponden a la respuesta de la planta inducida por la expresión de genes de virulencia del patógeno. La expresión de estos genes está regulada, entre otras cosas, por factores población dependiente, como es el caso del quorum-sensing. Las células bacterianas son capaces de detectar concentraciones extracelulares de alguna molécula señal producida por la población de bacterias y, superado determinado umbral de ésta, se activa la expresión de genes vinculados a la patogenicidad

(Andrade et al., 2006; Barnard y Salmond, 2007; Guo et al., 2012). Una forma de disminuir la expresión de síntomas, fenómeno observado luego de los tratamientos con productos cúpricos, podría deberse a que el cobre disminuye la población de Xcc dentro de los tejidos, lo que estaría retardando o eliminando la señal encargada de desencadenar los procesos patogénicos.

A nivel molecular, los productos a base de cobre podrían alterar la expresión de genes vinculados con la multiplicación y patogenicidad. Como se comentó anteriormente, en el contacto patógeno-célula vegetal se induce la expresión de ciertos genes responsables de establecer la enfermedad en hospederos susceptibles o una reacción de hipersensibilidad en interacciones incompatibles. A través de los sistemas de secreción se liberan proteínas efectoras que ya en el núcleo son las responsables de la desregulación celular (Vojnov et al., 2010; Domingues et al., 2010). La secuenciación completa del genoma de Xcc, finalizada en el año 2002 (da Silva et al., 2002), permitió analizar la existencia de varios genes involucrados en la patogénesis (Tondo et al., 2010). En un trabajo de Astua-Monge et al., 2005 se observó que algunos genes de virulencia, genes asociados con el sistema de secreción tipo III, y otros que participan en el proceso de patogénesis presentan una expresión alterada cuando la bacteria crece en un medio que simula el espacio intercelular de la planta. Se han generado mutantes de Xcc en algunos genes asociados con la patogenicidad y se observó la pérdida o disminución de la capacidad de desarrollar cancro en plantas de citrus (Rigano et al., 2007; Siciliano et al., 2006).

Con el fin de comprender mejor el mecanismo de acción de los compuestos a base de cobre sobre Xcc, en este trabajo se analizó la multiplicación de la bacteria y la expresión de algunos genes de patogenicidad que están implicados en la generación de la enfermedad. También se evaluó la inducción del estado VBNC provocado por estos compuestos a base de cobre, en la planta.

1.7.1 - Genes seleccionados para el análisis de expresión

A continuación se detallan los genes que fueron seleccionados para el análisis de expresión en bacterias extraídas de plantas tratadas con el agroquímico a base de cobre, y en bacterias que estuvieron en contacto con CuSO_4 en ensayos *in vitro*.

1.7.1.1 - Genes del sistema de secreción tipo III (SST3): *hrpG* y *hrcR*

Como se mencionó anteriormente, la proteína HrpG forma parte del sistema de dos componentes que regula el cluster *hrp* a través de la inducción de la proteína *hrpX* y *hrcC*. Los genes *hrpG* y *hrpX* no pertenecen al cluster *hrp* (figura 9).

Por otro lado, el gen *hrcR* codifica una proteína que forma parte del SST3. En el trabajo de Dunger et al (2005) se observó que mutantes en el operón *hrpD*, que afecta los genes *hrcQ*, *hrcR* y *hrcS*, no generan síntomas cuando son inoculados en plantas de naranja (*Citrus sinensis* cv. *Petropolis*).

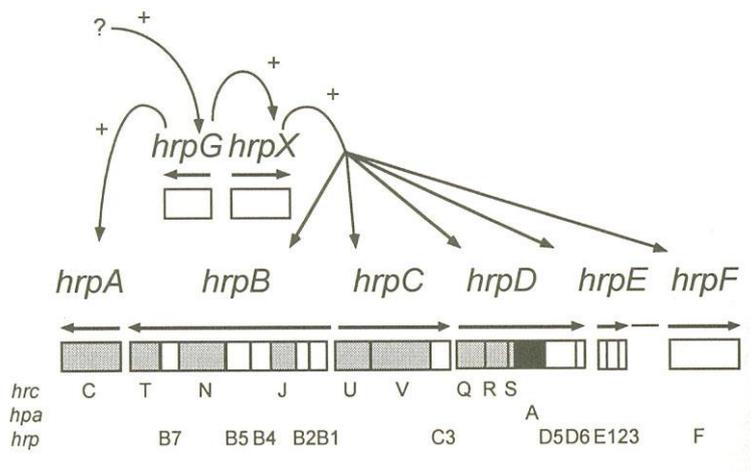


Figura 9. Esquema de la organización estructural del cluster *hrp* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Consiste en 6 operones, *hrpA*-*hrpF*. Los boxes en grises, correspondientes a los genes *hrc* codifican para componentes conservados del sistema de secreción tipo III. Los genes regulatorios *hrpX* y *hrpG* están localizados por fuera del cluster *hrp* (Bonas et al., 2000).

1.7.1.2 - Genes efectores del sistema de secreción tipo III (SST3): *avrXacE1* y *avrBs2*

En el trabajo realizado por Astua-Monge et al. (2005) se constató que los genes *avrXacE1* y *avrBs2* se sobre-expresan en el medio XVM2. El XVM2 es un medio sintético que mimetiza las condiciones internas del tejido vegetal, y se observó que induce la expresión de algunos genes *hrp* y *avr*. El efector *AvrBs2* pertenece a la familia *AvrBs2* (da Silva et al., 2002), y tiene un motivo glicerolfosforil diéster fosfodiesterasa. Esta proteína está presente en todas las especies de *Xanthomonas* y cumple un rol importante en la patogenicidad de la bacteria (Moreira et al., 2010).

1.7.1.3 - Genes efectores del sistema de secreción tipo II (SST2): *pglA* y *virK*

El gen *virK*, al igual que el *avrBs2* y *avrXacE1*, presenta en el promotor la secuencia PIPbox (Astua-Monge et al., 2005), secuencia que tienen muchos de los genes regulados por la proteína HrpX. El gen *pglA* codifica para una poligalacturonasa, enzima que participa en la virulencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* (patógeno de cítricos) (Chatterjee et al., 2008). Ambas proteínas son sustratos del SST2 y es inducida su expresión por la proteína HrpG en Xcc (Yamazaki et al., 2008; Guo et al., 2011)

2 - HIPOTESIS DE TRABAJO

Como hipótesis del trabajo se plantea que los agroquímicos a base de cobre, además del efecto bactericida observado en la superficie de la hoja de cítricos, disminuyen los síntomas de la enfermedad actuando sobre la virulencia y/o la multiplicación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) dentro del tejido vegetal. Uno de los efectos sobre la multiplicación bacteriana es la inducción del estado VBNC.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo general

Contribuir a la comprensión de los mecanismos de acción del cobre sobre el control del cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, de forma de optimizar o sustituir su empleo en el manejo integrado de la enfermedad.

3.2 - Objetivos específicos

- 1) Estudiar el efecto del cobre sobre la multiplicación de Xcc en plantas de cítricos
- 2) Analizar la inducción del estado VBNC de Xcc en plantas de cítricos tratadas con el producto a base de cobre.
- 3) Determinar el efecto del producto a base de cobre sobre la expresión de genes relacionados con la patogenicidad de Xcc durante su interacción con plantas de cítricos
- 4) Determinar cambios en la expresión de genes de patogenicidad en células de Xcc que entraron en estado VBNC, luego del tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en ensayos *in vitro*.

4 - MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 - Condiciones de crecimiento de plantas de cítricos y tratamiento con cobre

4.1.1 - Condiciones de crecimiento de las plantas cítricas

Para los ensayos se utilizaron plantas de pomelo (*Citrus paradisi*) de 5 meses de edad crecidas en macetas con tierra a partir de semillas. Las plantas fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas y aquellas utilizadas para los diferentes ensayos se mantuvieron en cuarto separado con una temperatura de 25-28°C y un fotoperíodo de 16hs luz (figura 10 y figura 11).



Figura 10: Invernáculo instalado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable para el crecimiento de las plantas de cítricos bajo condiciones controladas de luz y temperatura.



Figura 11: Cuarto de plantas instalado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable donde se mantienen las plantas utilizadas para los diferentes ensayos, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

4.1.2 - Tratamiento con cobre

La fuente de cobre utilizada fue la formulación comercial de óxido cuproso (Cu_2O), *Nordox75™*. Se ha observado que dicho producto comercial determina un buen control de la enfermedad en campo (Mara e Ibañez, 2004). La aplicación de cobre se realizó mediante aspersor manual. Para los diferentes ensayos se rociaron plantas de pomelo con una solución de 2,25mg/ml de *Nordox75™*, correspondiente a tres veces la dosis utilizada en la producción, la cual denominamos *Nordox 3X*. La dosis a utilizar (*Nordox 3X*) se obtuvo de un ensayo realizado en nuestro laboratorio donde se constató que las plantas tratadas con una sola aplicación a dicha concentración presentaban menos síntomas que las no tratadas, reproduciendo los resultados observados en el campo con varias aplicaciones.

4.2 – Ensayos de inoculación y extracción de ácidos nucleicos

4.2.1 - Mantenimiento y condiciones de crecimiento de la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc)

Para los ensayos se utilizó un aislamiento de Xcc obtenido de fruta de Uruguay (del Campo et al., 2009). La bacteria, conservada en glicerol 30% a -80°C , fue crecida en medio NBXcc sólido (*NutrientBroth*-agar: 23g de NB, 1g de glucosa y 15g de agar por litro) e incubada a 28°C durante 48hs. A partir de colonias aisladas de Xcc se inoculó en medio NBXcc líquido que se incubó a 28°C con agitación over night (ON) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.230 unidades de absorbancia a 600nm, correspondiente a un cultivo de 10^8 ufc/ml. Una vez obtenido el cultivo líquido se inocularon en hoja de pomelo las diluciones adecuadas para los diferentes ensayos.

4.2.2 – Método de inoculación de Xcc en hoja de pomelo

Las inoculaciones se realizaron en la cara abaxial de la hoja por infiltración con jeringa sin aguja (figura 12). Para ello se utilizaron hojas de pomelo con un desarrollo aproximado de 75% a 100% de su tamaño final, período de mayor sensibilidad (Graham et al., 1992). Las diluciones necesarias para obtener una población de trabajo de 10^6 ufc/ml se realizaron en el tampón fosfato salino (PBS 1X: NaCl 140mM, KCl 2.7mM, Na_2HPO_4 10mM y KH_2PO_4 1.5mM; pH 7.4).



Figura 12. Inoculación de Xcc mediante infiltración en la cara abaxial de hojas de pomelo.

4.2.3 - Recuperación de Xcc a partir de plantas cítricas inoculadas (“exudación”)

Para la recuperación de las bacterias a partir de plantas de pomelo, las hojas inoculadas con Xcc fueron cortadas de las plantas cítricas. La superficie de las mismas fue desinfectada con alcohol 70% para eliminar las bacterias presentes en el exterior, y en el caso de las plantas a las cuales se le aplicó Norodox 3X, para eliminar el producto acumulado en la superficie. Previo al procesamiento del material vegetal, las hojas fueron fotografiadas con una regla para determinar el área inoculada y calcular la cantidad de bacteria obtenida por cm² de tejido inoculado.

4.2.3.1 - Recuperación de la bacteria para curvas de crecimiento in planta

Las hojas inoculadas (entre 3 o 4 hojas por tiempo y por tratamiento) se colocaron en tubos oakridge con 30 ml de PBS 1X y se agitaron durante 40 minutos a temperatura ambiente, para permitir la exudación de las bacterias del tejido vegetal a la solución salina (PBS 1X). Se retiraron las hojas y se centrifugó la suspensión bacteriana durante 30 min a 4°C y 10000 rpm. El sobrenadante se eliminó y el pellet obtenido se resuspendió en 1ml PBS 1X, de los cuales 100 μ l se utilizaron para cuantificar el crecimiento bacteriano en medio sólido NBXcc y con el resto del volumen se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo de CTAB descrito más adelante.

4.2.3.2 - Recuperación de la bacteria para análisis de expresión de genes de patogenicidad

Se procedió de la misma forma descrita anteriormente, utilizando tiempos de agitación y de centrifugación menores con el fin de minimizar los cambios de expresión durante el procedimiento. Se utilizó el procedimiento descrito por Jacob et al. 2011. Tres o cuatro hojas inoculadas para cada tiempo y tratamiento, se cortaron en trozos pequeños para facilitar la

recuperación de bacterias, se colocaron en tubos con 20 ml de PBS 1X y se mantuvieron en hielo con agitación durante 7 min. Se retiró el tejido vegetal y se centrifugó la suspensión bacteriana durante 5 min a 10000 rpm y 4°C. Del pellet obtenido se extrajo el ARN utilizando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), según se describe más adelante.

4.2.4 - Extracción de ADN genómico de Citrus

Para evaluar que los cebadores utilizados no hibriden de manera inespecífica con el ADN de plantas de cítricos se realizó extracción de ADN de *Citrus paradisi* utilizando el *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de aproximadamente 0.1 g de tejido molido con N₂ líquido.

4.2.5 - Extracción de ADN genómico de Xcc

Para la cuantificación absoluta de Xcc mediante qPCR se realizó la extracción de ADN de bacterias recuperadas de plantas cítricas utilizando el protocolo de extracción con el método de CTAB (Ausubel, et al., 1987). El pellet obtenido, por centrifugación del “exudado” bacteriano, se re-suspendió en 582 µl de buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8) y se adicionaron 15 µl de SDS 20 % y 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló y se incubó entre 1 hora y 1 hora y media a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M, se mezcló y se agregaron 80 µl de solución CTAB/NaCl (4.1 g de NaCl y 10 g de CTAB en 100 ml de agua). Se incubó durante 10-20 min a 65°C (la solución de CTAB debe estar pre-calentada). Luego se agregaron, a temperatura ambiente, 700 µl de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), repitiéndose la centrifugación en las mismas condiciones. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN. Se incubó durante toda la noche a -20°C y luego se centrifugó durante 10 min a máxima velocidad. El pellet fue re-suspendido en 50 µl de agua ultrapura y se guardó en freezer a -20 °C hasta su uso.

4.2.6 - Extracción de ARN de Xcc, tratamiento con DNasa y síntesis del ADNc

4.2.6.1 - Extracción de ARN

Para la extracción se centrifugó el “exudado” bacteriano durante 5 minutos a 10000 rpm como ya se describió. El pellet se resuspendió en 100 µl de una solución de lisozima en buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8), a una concentración final de 0.4 µg/µl (stock 20 mg/ml preparado con agua tratada con DEPC) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se realizó la extracción de ARN bacteriano con *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó espectrofotométricamente mediante el uso de un equipo *Nanodrop1000 Spectrophotometer* (Thermoscientific).

4.2.6.2 - Tratamiento con DNasa I

Luego de la extracción de ARN se realizó el tratamiento con la enzima DNasa I (Invitrogen) para eliminar el posible ADN genómico presente en la muestra. Para ello se partió de 37ng de ARN en un volumen final de 15 µl y se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

La efectividad del tratamiento con DNasa I fue evaluada por PCR a tiempo final, usando los cebadores F1 y F2 para el 16S de Xcc diseñados por Alexandre do Amaral (comunicación personal). Como control positivo se utilizó ADN genómico de Xcc. Los resultados de la amplificación se evaluaron en gel de agarosa 2% mediante tinción con bromuro de etidio (1µg/ml).

En la tabla 1 y 2 se muestra la concentración de reactivos para un volumen final de 25 µl y las condiciones de ciclado, respectivamente.

Tabla 1. Concentración de reactivos utilizados en la PCR para evaluar la efectividad del tratamiento con DNasal.

Reactivos	Conc.uso	1x (µl)
MgCl ₂	25mM	4
Buffer	10x	2.5
dNTPs	2.5mM	2
16s F1	10µM	0.5
16s F2	10µM	0.5
<i>Taq polimerasa</i>	5U/rx	0.2
agua		14.3
ADN		1
Volumen final		25

Tabla 2. Condiciones de ciclado utilizadas en la PCR para evaluar la efectividad del tratamiento con DNasal.

95°C	-----	5min	} 30 ciclos
95°C	-----	30s	
60°C	-----	30s	
72°C	-----	1min	
72°C	-----	5min	

4.2.6.3 - Síntesis del ADNc

Para la síntesis del ADNc, a partir del ARN tratado con DNasa I, se sigue el procedimiento descrito en el protocolo del kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen). Dicho kit utiliza cebadores random hexámeros para la síntesis del ADN complementario. Para todas las muestras, se partió de 30 ng de ARN para un volumen final de reacción de 33 µl (≈1ng/µl).

4.3 - Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)

4.3.1 - Selección de genes y diseño de cebadores

Para evaluar el posible efecto del cobre en la multiplicación de Xcc dentro del tejido vegetal se realizaron curvas de crecimiento con la población bacteriana recuperada de tejido tratado y no tratado con cobre en diferentes tiempos. La cantidad de ADN bacteriano presente se calculó a través de la cuantificación por qPCR de un fragmento del gen *lrp* (*leucine-responsive regulatory protein*), el cual está presente en copia única en el cromosoma bacteriano (Cubero y Graham, 2004; Cubero y Graham, 2005).

Por otro lado, para el análisis de expresión se realizó una búsqueda bibliográfica de genes de Xcc que estuvieran implicados en la patogenicidad de la bacteria y su interacción con la planta (genes de virulencia, avirulencia, genes del sistema de secreción tipo III, enzimas, entre otros). Los genes seleccionados fueron: *avrXacE1*, *avrBs2*, *virK*, *hrpG*, *hrcR* y *pglA* (Astua-Monge et al., 2005; Mehta y Rosato, 2005; Yamazaki et al., 2008; Yamazaki et al., 2008b; Moreira et al., 2010; Dunger et al., 2005). El gen *lrp* (Cubero y Graham, 2004; Cubero y Graham, 2005) se usó como gen de referencia en los ensayos de cuantificación relativa para expresión génica. Dicho gen no presentó cambios de expresión en los diferentes tratamientos realizados. Los cebadores para los genes *avrXacE1*, *avrBs2*, *virK*, *hrpG*, *hrcR* y *pglA* fueron diseñados por Alexandre Do Amaral (comunicación personal). Los cebadores para el gen *lrp* fueron diseñados con el programa *Primer3-2.2* disponible online. Todos los cebadores utilizados para qPCR amplifican un fragmento de entre 100 – 200pb (tabla 3).

Tabla 3: Cebadores utilizados en la tesis para los análisis por qPCR.

Cebadores	Utilización	Secuencia	TM (°C)	Tamaño fragmento (pb)	
Irpfw	- Cuantificación absoluta de Xcc <i>in planta</i> - Gen de referencia para los ensayos de expresión de genes de patogenicidad	5' – GCGACTTCGACTATCTGCTC- 3'	62	133	
Irprev		5' – TCCTTGACCTCTCCATCAC – 3'	60		
avrXacE1 fw	- Análisis de expresión de genes de patogenicidad de Xcc <i>in planta</i> .	5'-ACAGCGATCCTGAAAGACG-3'	58	140	
avrXacE1 rev		5'- CTTGATACCAGAAAGCCTGC-3'	64		
avrBs2fw		5'-AGACAACGCGATCACACC-3'	56	158	
avrBs2 rev		5'-CAATCCGCTCCGTCTGC-3'	58		
virkwf		5'- AGCAGTTCATGCGCTACC -3'	56	121	
virkrv		5'- GCATTGATCTTGATTGATACG-3'	62		
hrpGfw		5'-CAGCACATCTACAAGTTGCG-3'	60	136	
hrpGrev		5'- CCTTGCTCATTGTCGTTGC-3'	58		
hrcRfw		5'- GGTGTTTATCGTCATCGACC-3'	60	161	
hrcRrev		5'- ACCGATAGCTCAGAACCAGG-3'	62		
pglAfw		5' – ACTCACCTTCAAGGGTGGC-3'	62	146	
pglArev		5'- CGGCAGTACCGAGTGATAGG-3'	64		
16s F1		-Evaluación del tratamiento del ARN con DNasa I	5' - CTGGAAAGTTCGTTGGATGT-3'	60	217
16s F2			5'-TGGTAGTCCACGCCCTAAACG-3'	66	

4.3.2 - Especificidad de los cebadores

La especificidad de los cebadores se evaluó *in silico* por comparación con las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y por la base de datos XBG-Xanthomonas Genome Browser (<http://xgb.fli-leibniz.de/cgi/index.pl>).

También se evaluó la especificidad por medio de un PCR a tiempo final utilizando como molde ADN genómico de pomelo. La concentración de reactivos y condiciones de ciclado son los mismos a los utilizados para la evaluación de la efectividad del tratamiento con DNasa I, descrito anteriormente (tablas 1 y 2). Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M) 2 % durante 1 h a 60 voltios, y los fragmentos se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1µg/ml), durante 5 minutos.

4.3.3 - Evaluación de los cebadores por PCR a tiempo final

Una vez diseñados los cebadores se evaluó la amplificación de cada uno de los genes seleccionados, tanto en ADN genómico, como en ADNc de Xcc. En este último caso, con el fin de evaluar si los cebadores detectan la expresión de los genes en estudio. Se realizó un PCR a tiempo final utilizando como molde ADNc generado a partir de ARN extraído de bacterias que fueron exudadas de plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua. Para la síntesis

del ADNc se partió de 0.5 ng/ μ l de ARN y se siguió el protocolo descrito en el kit de Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix, que utiliza como cebadores random hexámeros.

La concentración de los reactivos y condiciones de ciclado, utilizados para el ADN genómico de Xcc como para el cDNA, se resume en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Concentración de reactivos utilizados para evaluar la amplificación con los cebadores diseñados para el análisis de los genes de patogenicidad de Xcc.

Reactivo	Conc.uso	1x (μ l)
MgCl ₂	25mM	4
Buffer	10x	2.5
dNTPs	2.5	2
Cebador <i>forward</i>	10 μ M	0.5
Cebador <i>reverse</i>	10 μ M	0.5
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/ μ l	0.2
Agua		14.3
ADN		1
Volumen final		25

Tabla 5. Condiciones de ciclado para evaluar la amplificación con los cebadores diseñados para el análisis de los genes de patogenicidad de Xcc.

95°C	-----	5 min	} 30 ciclos
95°C	-----	30s	
60°C	-----	30s	
72°C	-----	1 min	
72°C	-----	5 min	

Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X 2% durante 1 h a 60 voltios, y los fragmentos se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml), durante 5 minutos.

4.3.4 - Clonado de los genes para la construcción de las curvas estándar

Para la obtención de la curva estándar, necesaria para la cuantificación absoluta de Xcc (gen *Irp*) y para el cálculo de las eficiencias de amplificación de los genes de patogenicidad y del gen de referencia, los productos de amplificación de cada gen fueron clonados en un vector *pGEM*®-Teasy (Promega).

4.3.4.1 - Clonado

Se realizó un gel preparativo, en agarosa 2 %, donde se sometieron a electroforesis 140 µl de cada producto de PCR. La electroforesis se realizó durante 1 h a 60 voltios. Una vez transcurrido el tiempo se tiñó el gel con bromuro de etidio (1µg/ml). Las bandas obtenidas fueron cortadas del gel y extraídas del mismo utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Posteriormente, los productos purificados se ligaron en el vector *pGEM®-Teasy* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.4.2 - Transformación

Para la transformación se utilizaron células de *Escherichia coli* competentes, de la cepa DH10B. Se descongelaron 100 µl de células competentes en hielo durante 5 minutos y se adicionaron 10 µl de la ligación realizada en el paso anterior, junto con los controles correspondientes (control del inserto, control sin inserto y el plásmido cerrado como control de transformación). Se mezcló suavemente y se dejó en hielo durante 15 minutos. El shock térmico se realizó durante 1 minuto a 42 °C y luego se colocó en hielo nuevamente. Las células competentes sometidas al shock térmico se colocaron en un tubo de vidrio y se agregaron 900 µl de medio LB (10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl por litro). Se dejaron en agitación en baño a 37°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, 100 µl de medio inoculado con cada una de las transformaciones se sembró en placa con medio LB con ampicilina (100 µg/ml) como medio de selección.

4.3.4.3 - Confirmación de los clones

Los clones que presentan el plásmido con el inserto fueron seleccionados por PCR a tiempo final y confirmados por secuenciación utilizando los cebadores universales SP6 y T7 que hibridan en el vector *pGEM®-Teasy*. La concentración de reactivos y condiciones de ciclado para la amplificación se detallan en las tablas 6 y 7.

Tabla 6: Concentración de reactivos utilizados para analizar los clones positivos

Reactivo	Conc.uso	1x (μl)
MgCl ₂	25mM	4
Buffer	10x	2.5
dNTPs	2.5	2
Cebador <i>forward</i>	10μM	0.5
Cebador <i>reverse</i>	10μM	0.5
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/μl	0.2
Agua		14.3
ADN		1
Volumen final		25

Tabla 7: condiciones de ciclado para analizar los clones positivos.

95°C	-----	5 min	} 30 ciclos
95°C	-----	30s	
60°C	-----	30s	
72°C	-----	1 min	
72°C	-----	5 min	

Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X 2 % durante 1 h a 60 voltios, y los fragmentos se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1 μg/ml), durante 5 minutos.

4.3.4.4 - Extracción de ADN plasmídico (*miniprep*)

La extracción de plásmidos a partir de los clones seleccionados se realizó según el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Se partió de un volumen de cultivo de 5 ml y se centrifugó durante 1 minuto a 6000 rpm. El pellet bacteriano se resuspendió en 0.3 ml de buffer 1 (50 mM tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA) con el agregado de RNasa a una concentración final de 100 μg/ml. Se adicionaron 0.3 ml de buffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0.3 ml de buffer 3 (3.0 M de acetato de potasio pH 5.5), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo. Luego se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 10 minutos y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio. El ADN presente en el sobrenadante obtenido se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70%. Se centrifugó durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet y se resuspendió en 50 μl de agua ultrapura estéril.

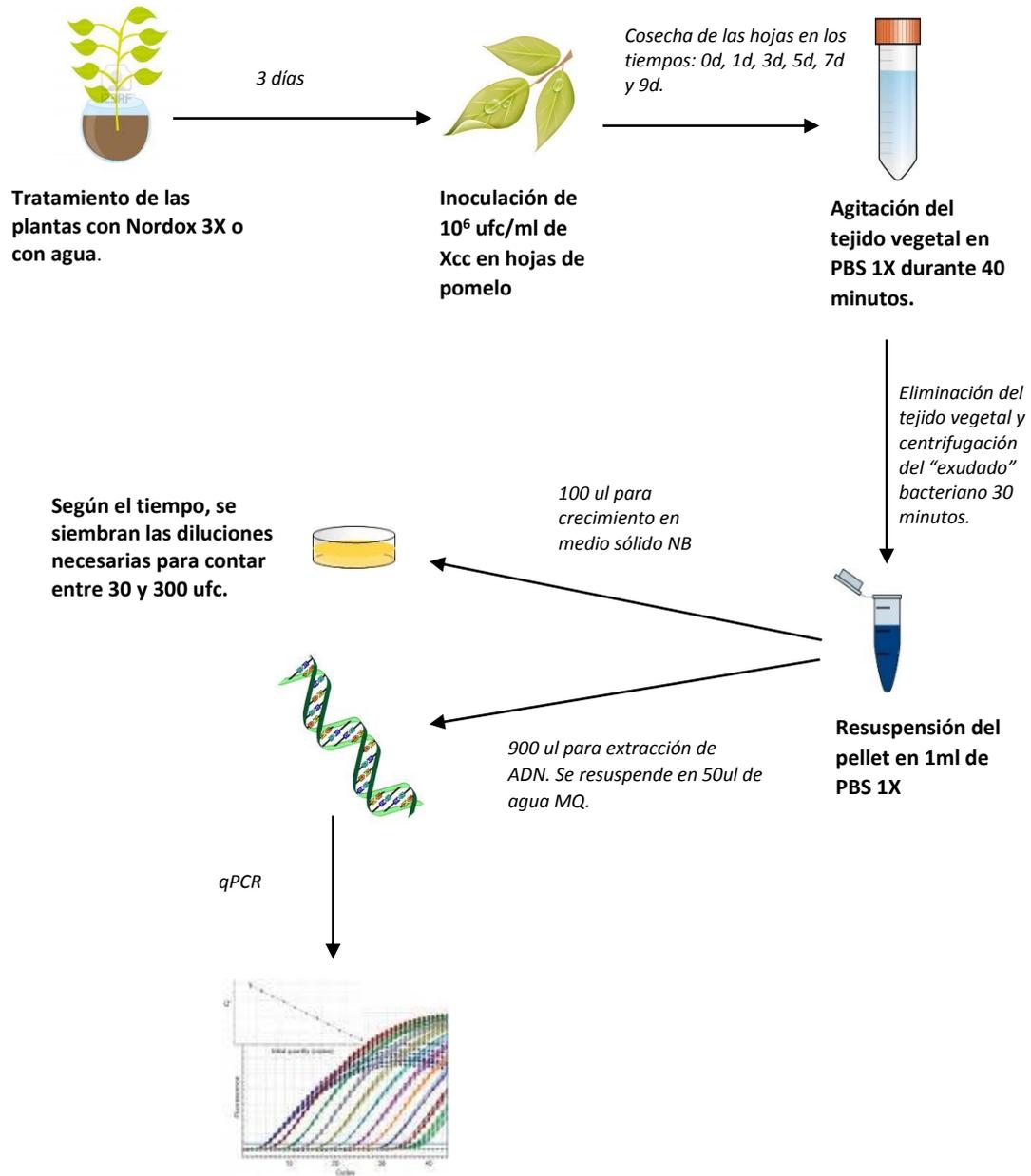
La extracción del plásmido que contiene el fragmento del gen de referencia *Irp*, denominado pGEM-*Irp*, que también se utilizó para la construcción de la curva estándar en la cuantificación absoluta por qPCR, se realizó con el kit GenCatch Plus Plasmid DNA Miniprep (PochLifeScience). El plásmido obtenido se cuantificó por espectrofotometría utilizando el equipo *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermoscientific) y por electroforesis en gel de agarosa 2% durante 1 h a 60 voltios. Para la cuantificación en gel se utilizó el marcador λ /pstI.

4.4 - Análisis de la multiplicación de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua

4.4.1 - Estrategia experimental

Para evaluar el posible efecto del cobre en la multiplicación de Xcc dentro del tejido vegetal se realizaron curvas de crecimiento con la población bacteriana recuperada de tejido tratado y no tratado con cobre en diferentes tiempos luego de la inoculación de plantas de cítricos. Se trabajó con un grupo de 6 plantines de pomelo. A tres plantas se les aplicó Nordox 3X con pulverizadora manual, y a las otras 3 plantas se les aplicó agua (grupo control). Al tercer día del tratamiento se inoculó una población de Xcc de 10^6 ufc/ml en varias hojas de cada plantín con el estado de desarrollo adecuado. La recuperación de la bacteria por “exudación” (punto 4.2.3.1) se realizó a tiempo inicial y luego de 1, 3, 5, 7 y 9 días posteriores a la inoculación. Para cada tiempo y cada tratamiento se tomaron una o dos hojas de cada planta. A partir de 1 ml de exudado bacteriano obtenido se tomaron 100 μ l para la cuantificación por crecimiento en medio sólido NBXcc y 900 μ l se utilizaron para la extracción de ADN por el método de CTAB (punto 4.2.5) y posterior cuantificación absoluta por qPCR. Se realizaron 3 réplicas biológicas del ensayo (figura 13).

Figura 13. Esquema de la estrategia experimental para las curvas de crecimiento



4.4.2 - Obtención de la curva estándar para la cuantificación absoluta por qPCR

En una cuantificación absoluta por qPCR se determina la cantidad de ADN blanco, expresando su concentración en número de copias por ml, μl u otra unidad. Para dicha cuantificación es necesario tener una curva estándar, la cual es construida usando diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida. Cada concentración está asociada a un valor umbral de amplificación o Ct (*threshold cycle*) determinado, obteniéndose una gráfica de Ct vs. log del nº de copias. El estándar utilizado fue el plásmido pGEM-*Irp* generado según el procedimiento descrito en el punto 4.3.4. Para el cálculo del número de copias/ μl se aplicó la siguiente fórmula (Smith, 2006):

$$\text{N}^\circ \text{ de copias}/\mu\text{l} = \frac{\text{conc. estándar (g}/\mu\text{l}) \times 6,023 \times 10^{23} \text{ (copias/mol)}}{\text{Peso molecular (g/mol)}}$$

Peso Molecular (g/mol) = (pb del plásmido+inserto) x 660g (correspondiente al peso molecular de un par de bases de ADN). El vector *pGEM-Teasy* tiene 3015 pb y el fragmento del gen *Irp* es de 133 pb.

Una vez cuantificado el estándar, se obtuvo la curva a partir de 6 diluciones seriadas al décimo del plásmido. Se realizó la amplificación por qPCR con el kit *Quantimix Easy Syg* (Biotools) que utiliza SYBRgreen como agente intercalante para la detección de la fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación. En las tablas 8 y 9 se detallan las concentraciones de los reactivos y el programa de ciclado. Se utilizó el termociclador *Rotor-Gene 6000* (Corbett).

Tabla 8. Concentraciones de reactivos para la construcción de la curva estándar del gen *Irp* por qPCR

Reactivos	Conc. Uso	1x (μl)
<i>Quantimix Easy Syg kit</i>	2x	5
<i>Irp forward</i>	10 μM	0.2
<i>Irp reverse</i>	10 μM	0.2
Agua		2.6
ADN		2
Volumen final		10

Tabla 9. . Condiciones de ciclado para la construcción de la curva estándar del gen *Irp* por qPCR.

95°C	-----	5 min	} 35 ciclos
95°C	-----	15s	
62°C	-----	15s	
72°C	-----	20s	
Melt 72°C	-----	95°C	

4.4.3 - Curvas de crecimiento

4.4.3.1 - Cuantificación por crecimiento en medio sólido

Para la construcción de curvas de crecimiento se tomaron 100 µl del extracto bacteriano y se sembraron en medio NBXcc agar, tanto el extracto puro (para el caso de los tiempos más tempranos) como diluciones, con el fin de obtener un número contable de colonias, entre 30 y 300 ufc por placa. Se evaluaron los tiempos 0d, 1d, 3d, 5d, 7d y 9d, para cada uno de los tratamientos. Las placas se incubaron a 28°C durante 48hs. Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada tiempo y por cada tratamiento.

4.4.3.2 - Cuantificación por qPCR

Para la cuantificación de Xcc por qPCR cuantitativo se utilizó el kit *Quantimix Easy Syg* (Biotools). La concentración de reactivos y programa de ciclado fueron los mismos que se utilizaron para la construcción de la curva estándar (tablas 8 y 9). Se evaluaron los tiempos 0d, 1d, 3d, 5d, 7d y 9d para cada uno de los tratamientos. En la misma corrida de qPCR se colocaron las muestras de interés y las diluciones correspondientes a la curva estándar. Se utilizó el termociclador *Rotor-Gene 6000* (Corbett). Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada tiempo y por cada tratamiento.

4.5 - Análisis de la inducción del estado VBNC de Xcc en plantas de cítricos tratadas Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.

4.5.1 - Estrategia experimental

Para los análisis de la inducción del estado viable pero no cultivable (VBNC) de Xcc se trabajó con una cepa que expresa la proteína reportera GFP (*Green Fluorescent Protein*), la cual denominamos Xcc-GFP. Dicha cepa es la misma utilizada en el trabajo de Rigano et al. (2007). Este ensayo se realizó con un grupo de 6 plantines de pomelo. A tres plantas se les aplicó Nordox

3X con pulverizadora manual, y a las otras 3 plantas se les aplicó agua (grupo control). Al tercer día del tratamiento se inoculó una población de Xcc-GFP de 10^6 ufc/ml en varias hojas de cada plantín con el estado de desarrollo adecuado. La recuperación de la bacteria por “exudación” (punto 4.2.3.1) se realizó en los tiempos 5d y 7d. Para cada tiempo y cada tratamiento se cortaron 6 hojas. A partir de 1 ml del “exudado” bacteriano obtenido se tomaron 100 μ l para la cuantificación por crecimiento en medio sólido NBXcc, de bacterias cultivables. El resto del exudado bacteriano se sometió a citometría de flujo para la determinación de bacterias totales/ml (vivas y muertas), utilizando la bacteria Xcc-GFP (a través de la detección citométrica de la fluorescencia emitida por Xcc-GFP). La cantidad de muertas/ml se determinó por tinción con yoduro de propidio (IP) a una concentración final de 0.02mg/ml. Esta molécula es incapaz de atravesar la membrana celular intacta, pero sí penetrar en las células que tienen la membrana dañada. Es un fluoróforo que emite en rojo al unirse al ADN (Lew et al., 2010). A partir de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de bacterias VBNC. El ensayo se realizó por triplicado (figura 14).

4.5.2 - Citometría de flujo

Para la calibración del citometro se utilizó una población de Xcc-GFP de 10^6 ufc/ml y una concentración de 10^6 microesferas/ μ l (*fluoSpheres[®] carboxylate modified microspheres 1.0 μ m, yellow-green fluorescent (505/515), 2% solids*) de Invitrogen™, las cuales se utilizan como referencia para calcular la cantidad de bacteria presente en la muestra. Para poder determinar bacterias muertas se ajustó el equipo con una población de Xcc-GFP tratada con etanol 70% durante 10 minutos para matar las células. El rango de trabajo óptimo de Xcc-GFP se determinó para una concentración de 10^6 microesferas/ml y se realizó una curva estándar de Xcc-GFP entre $10^3 - 10^7$ ufc/ml.

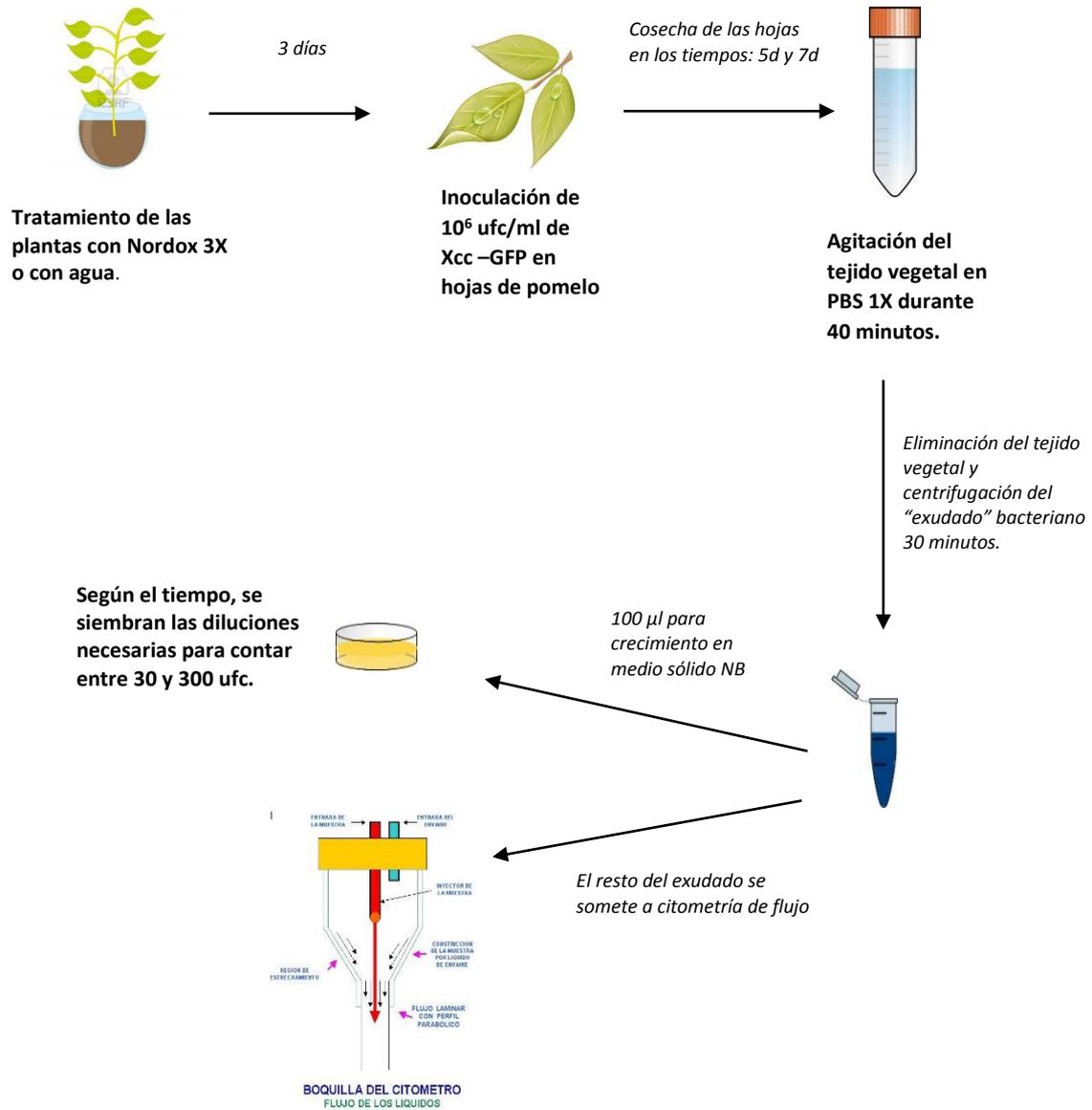
Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo y clasificador celular *FACSVantage* (BD) equipado con un láser de argón con emisión a 488 (Coherent, Innova 304) y un sistema de enfriamiento por circulación de agua. Para cada muestra se realizaron 20.000 adquisiciones y el análisis de datos se realizó con el programa *CELLQuest v.3.1*. La fluorescencia de las células emitidas por Xcc-GFP fue recogida por el canal FL1 y la fluorescencia emitida por el IP fue recogida por el canal FL3. Para realizar las medidas citométricas en flujo, se seleccionó una boquilla de 70 μ m creando una delgada columna líquida que contiene las células a analizar. A medida que cada célula pasa frente al láser (punto de interrogación), desvía el rayo incidente y las moléculas teñidas unidas a la célula van a ser excitadas y emiten luz fluorescente. La luz desviada (*forward scatter* y *side scatter*) y las señales fluorescentes son encaminadas por filtros

ópticos, de acuerdo a su longitud de onda, a los fotomultiplicadores (PMT) correspondientes. Finalmente, las señales son amplificadas por los PMT, digitalizadas y procesadas por el computador. Los resultados son presentados como histogramas o gráficos de puntos (dot-plots).

4.5.3 - Microscopio confocal

Los exudados bacterianos de Xcc-GFP obtenidos de las plantas tratadas con Nordox 3X y control fueron observados en el microscopio confocal *Olympus BX-61* del IIBCE utilizando los filtros adecuados para la detección de la fluorescencia GFP.

Figura 14. Esquema de la estrategia experimental para la determinación de la inducción del estado VBNC en células de Xcc recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua.



- **cuantificación de bacterias totales/ml por detección de la fluorescencia emitida por la GFP**
- **determinación del % de células muertas por tinción con IP.**

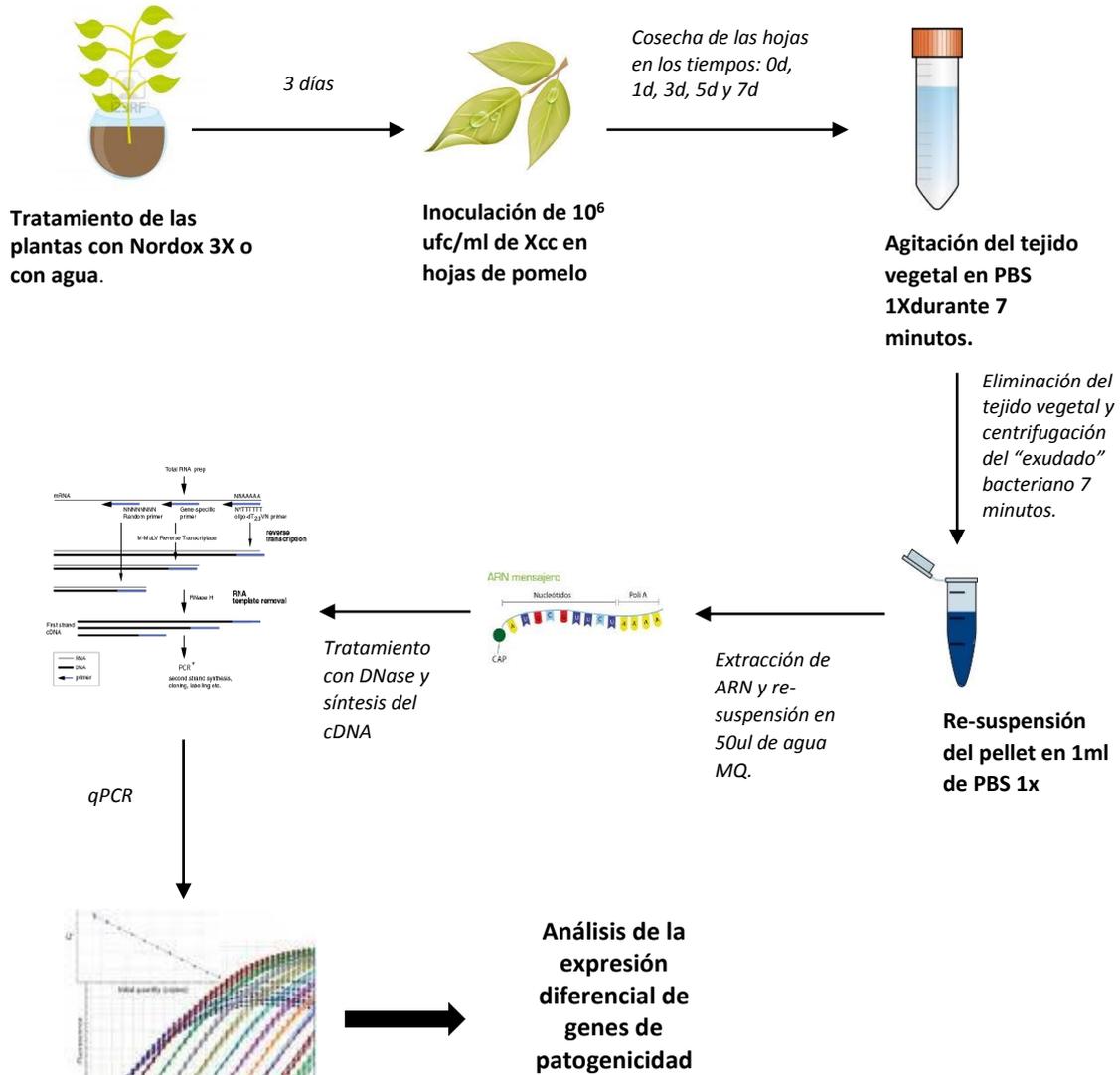
4.6 - Análisis de la expresión diferencial de genes de patogenicidad de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua

4.6.1 - Estrategia experimental

Para los ensayos de expresión diferencial se trabajó con un grupo de 6 plantines de pomelo. A tres plantas se les aplicó Nordox 3X y a las otras 3 plantas se les aplicó agua (grupo control), utilizando una pulverizadora manual. Al tercer día del tratamiento se inoculó una población de Xcc de 10^6 ufc/ml en varias hojas de los dos grupos de plantines. En la inoculación se tuvo en cuenta que las hojas tuvieran un tamaño y madurez adecuada. Se recuperó la bacteria del tejido vegetal luego de 1, 3, 5, 7 días posteriores a la inoculación según el procedimiento descrito por Jacob et al. (2011) (punto 4.2.3.2). Para cada tiempo y cada tratamiento se tomaron una o dos hojas de cada planta y se realizó un pool. Se extrajo el ARN total de la población de Xcc recuperada del tejido vegetal y se realizó la síntesis del ADNc como se describió en el punto 4.2.6. Se realizaron 3 réplicas biológicas. En la figura 15 se esquematiza la estrategia experimental para los ensayos de expresión.

A la hora de planificar y realizar los ensayos de expresión por qPCR se tomaron en cuenta las recomendaciones MIQE (*minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) (Taylor et al., 2010).

Figura 15. Esquema de la estrategia experimental para los análisis de expresión de genes de patogenicidad de *Xcc* in planta



4.6.2 - Cuantificación relativa

Se realizó la cuantificación relativa de la expresión de los genes de patogenicidad seleccionados, en plantas de cítricos tratadas con Nordox 3X respecto a su expresión en plantas tratadas con agua (muestra de referencia o calibradora). En ambos casos se utilizó el gen *Irp* como gen de referencia para normalizar la cantidad de ARN utilizado en cada muestra. Previamente, se verificó que el gen de referencia no cambió su nivel expresión en ambos tratamientos.

4.6.2.1 - Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y cálculo de las eficiencias de amplificación

Para el cálculo de los niveles de expresión de cada gen se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001). El análisis de expresión relativa por este método requiere ciertas ecuaciones y asunciones para poder analizar de forma apropiada los datos. Para que los cálculos puedan ser válidos, las eficiencias de la amplificación de los genes de interés y del gen de referencia deben ser similares y cercanas a 1. Por lo tanto, para poder aplicar este método se calcularon las eficiencias de amplificación de cada gen analizado. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de los diferentes plásmidos que contienen la secuencia de los genes de interés y se construyó una curva estándar para cada uno de ellos. La pendiente de la curva estándar es un indicativo de la eficiencia de la reacción. Una curva estándar ideal posee una pendiente de 3.3, que significa que la PCR tuvo una eficiencia de 1. En esta situación ideal el producto de PCR se duplicó en cada ciclo. Una vez calculada la eficiencia de cada gen se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\Delta C_T(\text{muestra}) = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia (Irp)}$$

$$\Delta C_T(\text{control}) = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia (Irp)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{muestra}) - \Delta C_T(\text{control})$$

$$\text{Nivel de expresión normalizado del gen de interés en cada muestra} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

4.6.2.2 - Controles de qPCR

Cuando se analiza la expresión por PCR cuantitativo es necesario realizar algunos controles que evalúen la presencia de ADN genómico y su influencia en la expresión de genes de bajo número de copia. También es importante verificar que el tratamiento con DNasa I no interfiera con el proceso de amplificación. Para ello se inoculó una población de Xcc de 10^6 ufc/ml en plantas que no fueron tratadas con cobre y se exudó la bacteria al séptimo día. Luego se realizó la extracción de ARN, el tratamiento con DNasa I y la síntesis de cDNA, como fue descrita anteriormente

(punto 2.5). Los controles realizados fueron: **A)** ARN tratado con DNasa I y con retrotranscripción (ARN c/DNasa y c/RT), **B)** ARN tratado con DNasa I y sin retrotranscripción (ARN c/DNasa y s/RT), **C)** ARN sin tratar con DNasa I y con retrotranscripción (ARN s/DNasa I y c/RT) y, **D)** ARN sin tratar con DNasa I y sin retrotranscripción (ARN s/DNasa I y s/RT). Los controles B y D evalúan la efectividad del tratamiento con DNasa y la presencia de ADN genómico en la muestra, respectivamente. Los controles A y C evalúan si la enzima DNasa interfiere con el PCR cuantitativo. Los cebadores utilizados amplifican el ADNr 16S, que son los mismos que se utilizaron para la evaluación del tratamiento con DNasa en PCR a tiempo final.

Para este ensayo se trabajó con el exudado puro y las diluciones 1/2, 1/4 y 1/8, para evaluar si hay inhibición.

4.6.2.3 - qPCR

Para todas las reacciones de qPCR se utilizó el kit *Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR* (Qiagen) con la siguiente concentración de reactivos y programas de ciclado que se detalla en las tablas 10 y 11, respectivamente. Se utilizó el termociclador *Rotor-Gene 6000* (Corbett).

Tabla 10. Concentración de reactivos para los ensayos de expresión por qPCR.

Reactivo	Conc. uso	1x (µl)
Master Mix	2x	6.25
Cebador <i>forward</i>	10 µM	1.25
Cebador <i>reverse</i>	10 µM	1.25
Agua		1.75
ADNc		2
Volumen final		12.5

Tabla 11. Condiciones de ciclado para los ensayos de expresión por qPCR.

95°C	-----	5min	} 35 ciclos
95°C	-----	5s	
62°C	-----	10s	
Melt 72°C	-----	95°C	

4.7 - Determinación de los cambios en la expresión de genes de patogenicidad en células de *Xcc* que entraron en estado VBNC, luego del tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ mediante ensayos *in vitro*.

4.7.1 - Estrategia experimental

Para los ensayos de inducción de VBNC se expuso una población de Xcc de 10^6 ufc/ml a una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 135 μM durante 10 min. Dicha concentración de cobre es equivalente a la dosis de cobre soluble presente en la solución de Nordox 3X, determinada por análisis espectrofotométrico realizado en el Laboratorio de Espectrometría Atómica del LATU. Como control, una población de 10^6 ufc/ml de Xcc se expuso a agua ultrapura durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se tomaron 100 μl para la cuantificación de bacteria cultivable en medio NBXcc y otra alícuota se inoculó en hojas de pomelo para evaluar el desarrollo de síntomas. Con el resto del volumen ($\approx 800\mu\text{l}$) se realizó la extracción de ARN para el análisis de expresión de los genes de patogenicidad. La extracción de ARN se realizó con el *RNeasy Mini kit* (Qiagen) y el tratamiento con la enzima *DNasa I* (Invitrogen™), como se describió en los puntos 4.2.6.1 y 4.2.6.2 respectivamente. La síntesis del ADNc se realizó con la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) según las instrucciones del fabricante.

Para las reacciones de qPCR se utilizó el kit Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR (Qiagen) con la concentración de reactivos y programas de ciclado que se detalla en las tablas 10 y 11, respectivamente. Se utilizó el termociclador *Rotor-Gene 6000* (Corbett).

4.8 Análisis estadístico.

Todos los ensayos cuantitativos fueron realizados siguiendo un diseño experimental completamente al azar con tres réplicas biológicas por tratamiento. Para cada ensayo se analizó el cumplimiento de los supuestos teóricos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba t-Student o de Kruskal-Wallis con un nivel de significación de 0.05. Se utilizó el programa Infostat versión 2012 (Di Rienzo et al., 2012).

5 - RESULTADOS

5.1 - Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)

5.1.1 - Especificidad de los cebadores

Los resultados obtenidos *in silico* con la base de datos *Xanthomonas Genome Browser* y NCBI confirmaron que los cebadores diseñados son específicos para los genes *hrpG*, *virk*, *avrXacE1*, *avrBs2*, *hrcR*, *pglA* y *lrp* de *Xcc*. Todos estos genes se encuentran en el cromosoma de *Xcc* en copia única.

La especificidad de los cebadores también fue analizada por PCR en tiempo final, usando como molde ADN genómico de pomelo. En las figuras 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos.



Figura 16. Evaluación de la especificidad de los cebadores mediante amplificación de ADN genómico de pomelo. Carriles 1) gen *lrp*, 2) blanco *lrp*, 3) gen *virk*, 4) blanco *virk*, 5) gen *hrpG*, 6) blanco *hrpG*, 7) gen *hrcR*, 8) blanco *hrcR*, 9) Producto de amplificación de 222 pb utilizado como referencia del peso molecular.

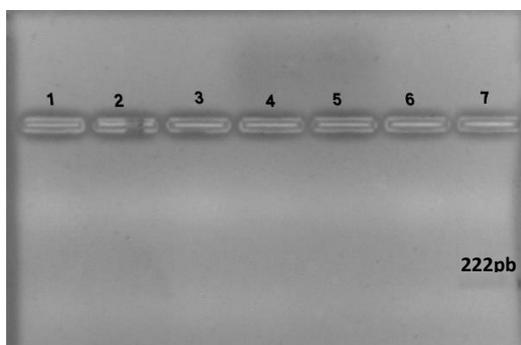
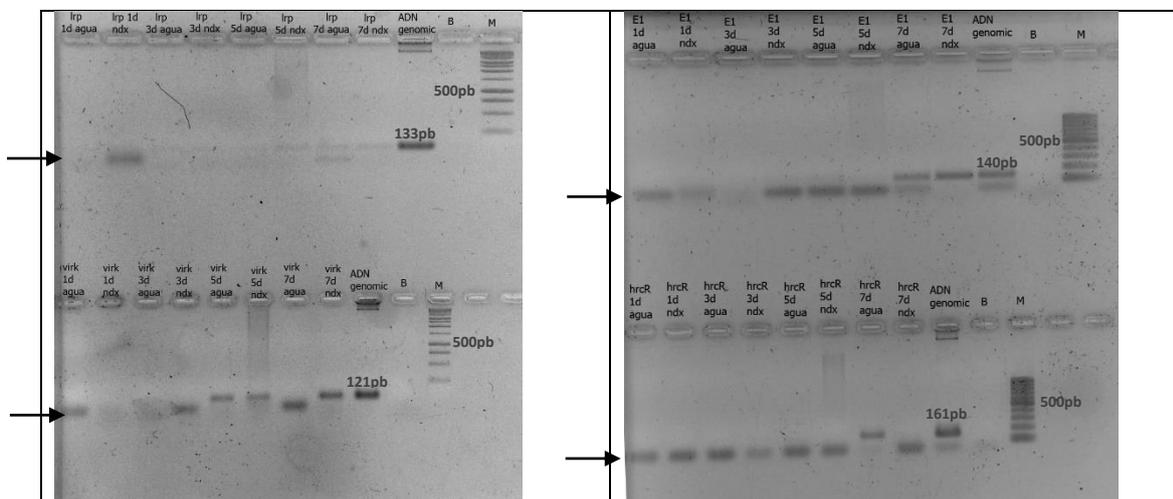


Figura 17: Evaluación de la especificidad de los cebadores mediante amplificación de ADN genómico de pomelo. Carriles 1) gen *pglA*, 2) blanco *pglA*, 3) gen *avrXacE1*, 4) blanco *avrXacE1*, 5) gen *avrBs2*, 6) blanco *avrBs2*, 7) Producto de amplificación de 222 pb utilizado como referencia del peso molecular.

Se puede observar que no existió amplificación con el ADN genómico de pomelo, por lo cual, no existe hibridación cruzada, siendo los cebadores específicos para Xcc.

5.1.2 - Evaluación de los cebadores con ADN genómico y ADNc de Xcc

En una primera instancia los cebadores diseñados se evaluaron mediante amplificación por PCR a tiempo final utilizando como molde ADN genómico de Xcc y muestras de ADNc obtenidas a partir del ARN extraído de la exudación de bacterias de plantas inoculadas con Xcc. Todos los cebadores diseñados amplificaron un producto del tamaño esperado (figura 18). En todos los casos, la banda obtenida a partir de ADN genómico es más intensa que las obtenidas para las muestras de ADNc, seguramente debido a la mayor concentración de molde. Para el caso de los ADNc copia, en general las bandas más intensas se obtuvieron para las muestras más tardías (5 días y 7 días posteriores a la inoculación). Para los tiempos 1 y 3 días la baja intensidad de las bandas podría deberse a dos factores: 1) baja expresión de los genes analizados, 2) bajo número de transcritos obtenidos debido a la metodología utilizada para la recuperación de bacterias de la planta. Probablemente, en los tiempos más tempranos la cantidad de bacteria que se obtiene sea baja y, por lo tanto, no se pueda extraer suficiente cantidad de ARN. Ya ha sido reportada la dificultad de obtener suficiente cantidad de bacteria (y por lo tanto de ARN) para análisis de expresión, a partir de tejido vegetal inoculado (Astua-Monge et al., 2005).



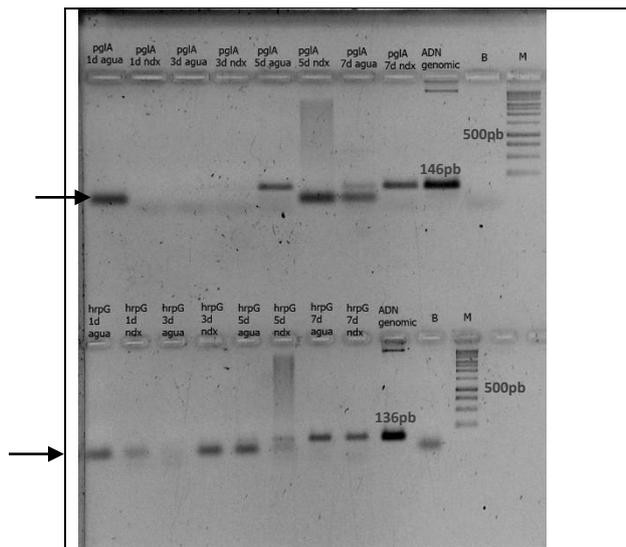


Figura 18: Amplificación a tiempo final con los cebadores diseñados, utilizando como molde ADN genómico y ADNc extraído a partir de las bacterias exudadas de plantas de pomelo inoculadas con Xcc luego de 1, 3, 5 y 7 días. B: blanco; M: 100pb ladder. Las flechas indican la altura correspondiente a los dímeros de primers.

Las muestras se sometieron a electroforesis con un marcador de peso molecular de 100pb ladder (Dongsheng biotech). Todas las bandas obtenidas tienen el tamaño esperado, entre 100-200pb (tabla 3). Las bandas presentes en algunas de las muestras que se encuentran por debajo del tamaño esperado corresponde a primers.

5.2 - Análisis de la multiplicación de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua

5.2.1 - Cuantificación de Xcc in planta por crecimiento en medio sólido

Para la cuantificación se inoculó una población de Xcc de 4×10^6 ufc/ml. El volumen obtenido del extracto bacteriano corresponde a un área de tejido determinada, por lo tanto, la cantidad de bacteria obtenida se expresó como \log ufc/cm² (figura 19). En el apéndice 2, tabla 2 se detallan los resultados de cuantificación por crecimiento en placa para las 3 réplicas biológicas.

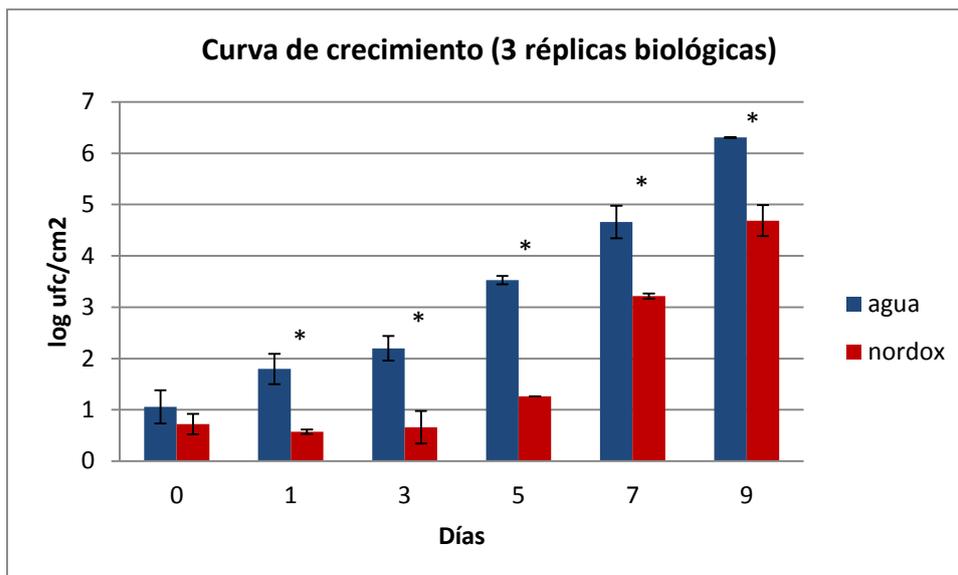


Figura 19. Cuantificación de *Xcc in planta* por crecimiento en medio sólido: resultados expresados como log ufc/cm² de hoja para plantas de pomelo tratadas con agua o Nordox 3X para diferentes tiempos luego de la inoculación con *Xcc*. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas por tratamiento y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos según el test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento de *Xcc* en medio sólido, mostraron que hay un menor crecimiento en placa de bacterias que fueron recuperadas de plantas tratadas con el compuesto a base de cobre, Nordox 3X. De acuerdo con el test estadístico no-paramétrico Kruskal-Wallis, se observó una diferencia significativa de la concentración de bacteria cultivable entre los días 1 al 9. Esta diferencia puede ser debida a que haya una menor multiplicación bacteriana en las plantas tratadas con cobre o, al efecto que este producto pueda tener en la inducción del estado de VBNC en *Xcc*.

5.2.2 - Cuantificación de *Xcc in planta* por qPCR

5.2.2.1 - Obtención de la curva estándar para el gen *lrp*

Para la cuantificación absoluta de *Xcc in planta* mediante qPCR se construyó una curva de calibración a partir del producto de amplificación del gen *lrp* clonado en el vector *pGEM-Teasy*, denominado *pGEM-lrp*, cuya concentración es de $\approx 60\text{ng}/\mu\text{l}$ (apéndice 1, figura 1).

Se calculó el nº copia/ μl aplicando la ecuación que se detalló previamente en materiales y métodos (punto 4.4.2). El número de copias presentes en el estándar puro fue de 1.74×10^{10} nºcopias/ μl . Se prepararon diluciones seriadas de la suspensión del plásmido *pGEM-lrp* que se analizaron mediante qPCR para la construcción de la curva estándar. Se obtuvo una buena curva

con las diluciones -2, -3, -4, -5, -6 y -7, cuyos parámetros fueron: $R=0.998$, Pendiente= -3.4 y Eficiencia=0.96 (figuras 20 y 21). En el apéndice 2, tabla 3 se muestran los Cts obtenidos para cada una de las diluciones analizadas.

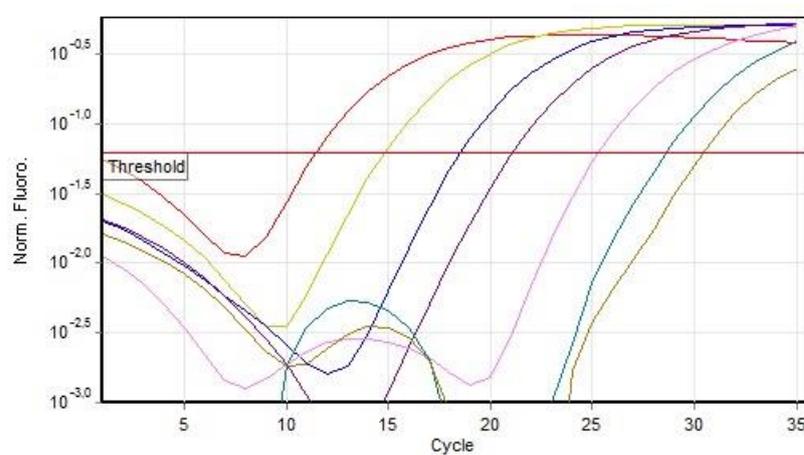


Figura 20. Curvas de amplificación de las diluciones del plásmido pGEM-*lrp*, obtenidas por qPCR.

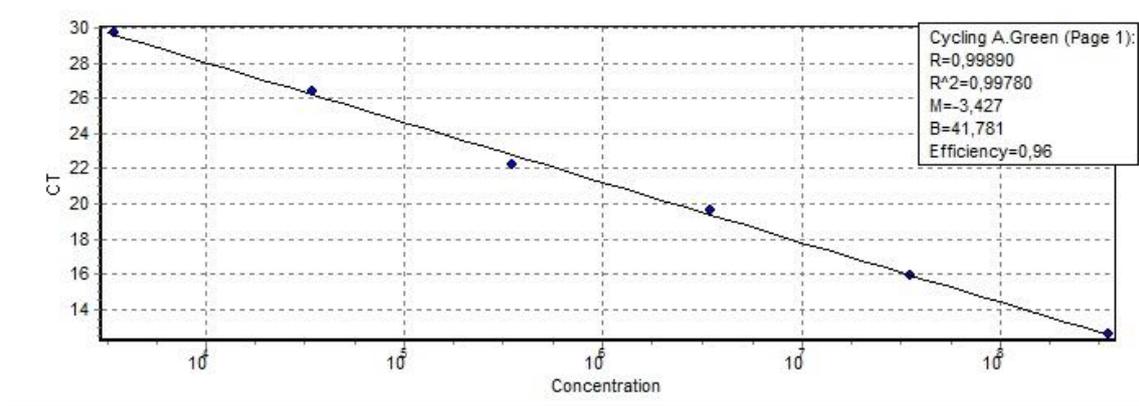


Figura 21. Curva estándar correspondiente a la amplificación por qPCR utilizando los cebadores diseñados para el gen *lrp*.

La especificidad de los productos amplificados se analizó a través del análisis de la curva de *melting*, de los productos. Se puede observar que todos los amplicones tienen un único pico de *melting* característico, entre 89.0 – 89.2 (figura 22).

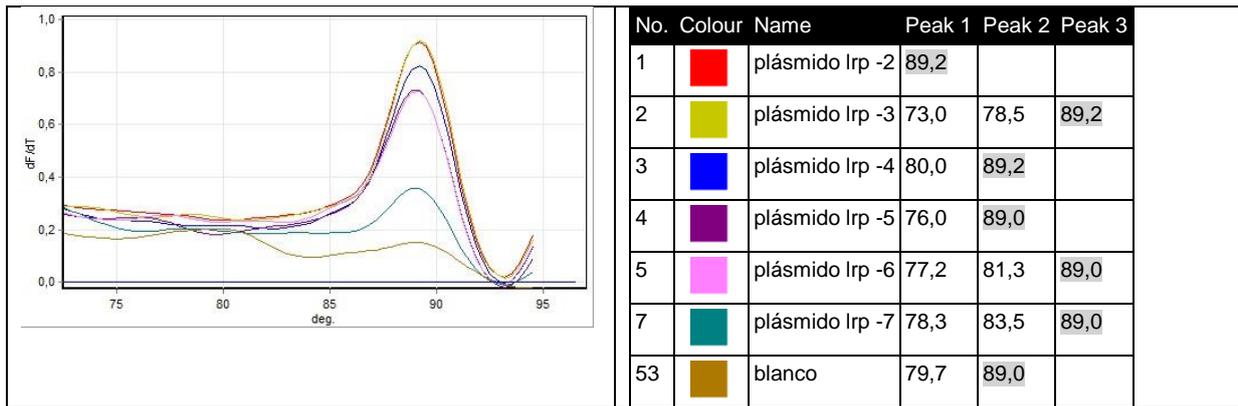


Figura 22. Picos de *melting* obtenidos con las diluciones utilizadas para la construcción de la curva estándar del gen *Irp*.

En la figura 22 también puede observarse el mismo pico para el blanco. Esto probablemente se deba a contaminación de alguno de los reactivos, la cual no se pudo eliminar a pesar de preparar alícuotas nuevas de los cebadores, cambiar el agua y utilizar otro tubo de mix de qPCR. De todas maneras, las muestras tienen un Ct aproximadamente 2 ciclos antes que el blanco, por lo que se considera que la contaminación presente no influye de manera significativa en los resultados de cuantificación.

5.2.2.2 – Cuantificación de *Xcc* in planta

La población bacteriana recuperada del tejido vegetal en los diferentes tiempos también se cuantificó por qPCR, utilizando la curva estándar construida para el gen *Irp* de *Xcc*. Todas las muestras obtenidas en los diferentes tiempos y en ambos tratamientos, caen dentro del rango de sensibilidad de la curva de calibración (Apéndice 2: figuras 2-5; tablas 4 y 5).

Para las muestras correspondientes a los 9 días posteriores a la inoculación se observó un efecto de inhibición de la amplificación, lo que se reflejó en un cambio en las curvas de amplificación (Apéndice 2, figuras 3 y 5). Este efecto se atribuyó a la alta concentración de ADN obtenida en estas muestras, por lo que se realizaron dos diluciones seriadas logrando así levantar la inhibición.

Para evaluar la especificidad de los productos obtenidos se realizaron las curvas de *melting*. Se pudo observar que las reacciones de amplificación generan un único producto que corresponde al fragmento de interés, cuyos T_m está entre 89.0 y 89.2 °C (Apéndice 2, figura 6).

El número de copias del gen de interés se obtiene a partir del ADN de las bacterias que fueron inoculadas en un área determinada de la hoja. Por lo tanto el número de copias del gen (que corresponde a la cantidad de bacterias presentes) se expresa como log del nº de copia/cm² de

tejido (figura 23). En el Apéndice 2, tabla 6 se detallan los Cts obtenidos por qPCR para cada una de las repeticiones biológicas.

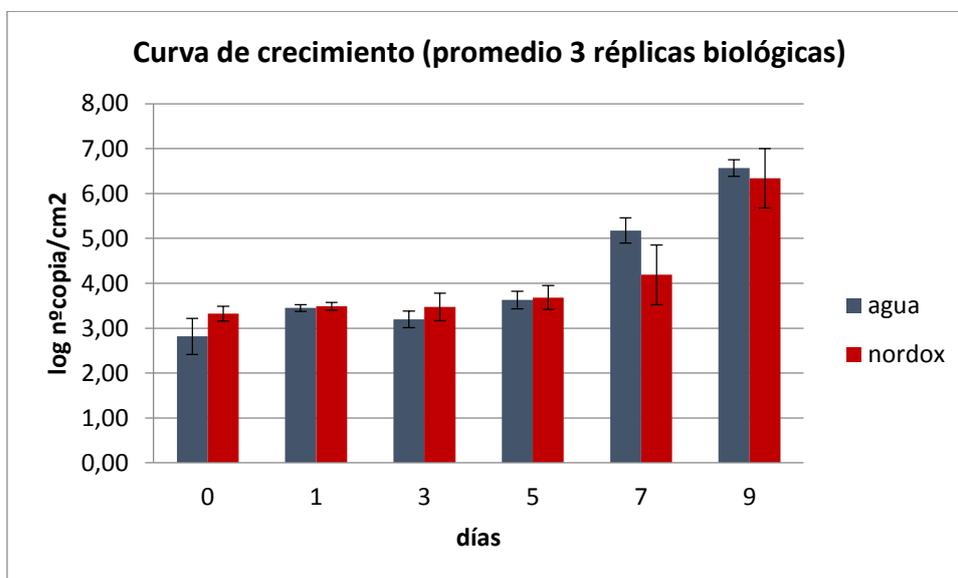


Figura 23. Cuantificación de *Xcc in planta* por qPCR: resultados expresados como log n° de copia del gen *lrp/cm*² de hoja para plantas de pomelo tratadas con agua o Nordox 3X a diferentes tiempo luego de la inoculación con *Xcc*. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas por tratamiento y las barras el error estándar.

Los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento a partir de la cuantificación de la bacteria por qPCR muestran que no existe diferencia significativa entre la cantidad de bacteria obtenida de plantas tratadas con Nordox 3X y de plantas control (según el test estadístico no-paramétrico Kruskal-Wallis, $p < 0.05$ para todas las comparaciones realizadas).

5.2.3 - Comparación entre crecimiento en medio sólido y cuantificación absoluta por qPCR para cada tratamiento

Cuando se realiza una cuantificación bacteriana por crecimiento en placa se asume que cada colonia fue originada por una única bacteria. Por otro lado, cuando se realiza la cuantificación bacteriana por medio de una PCR cuantitativa, se asume que el n° de copias de un gen determinado corresponde a la cantidad de bacteria presente en el cultivo original. Esto es así cuando se trabaja con genes que se encuentran en el genoma bacteriano en copia única, como es el caso del gen *lrp* utilizado en este estudio. Por lo tanto, el número de copias obtenidas en cada muestra corresponde al número de bacterias presentes en la muestra. Para poder analizar mejor los resultados obtenidos, se representaron en un mismo gráfico los valores de

cuantificación de *Xcc in planta* obtenidos por ambos métodos para cada uno de los tratamientos realizados (agua y Nordox 3X) (figuras 24 y figura 25).

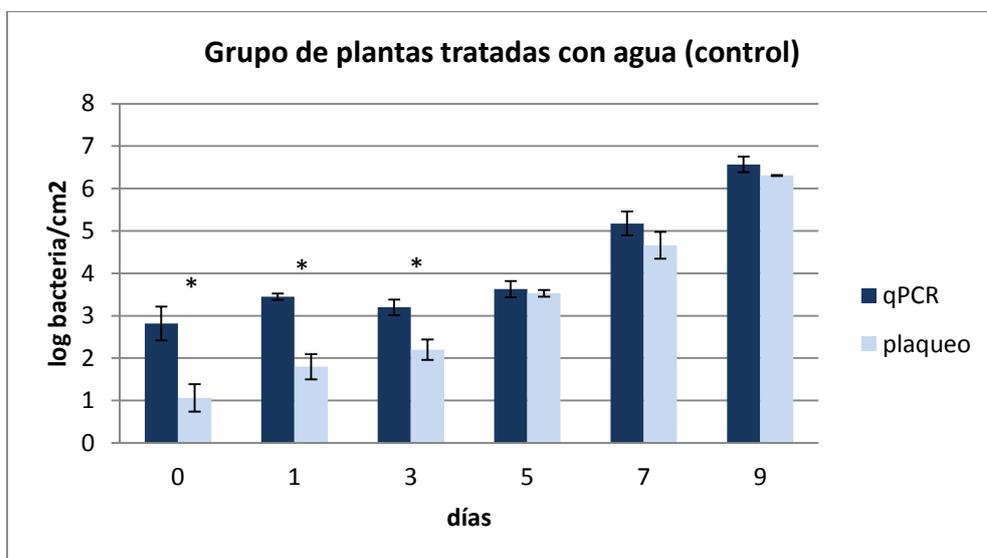


Figura 24. Cuantificación de *Xcc* por crecimiento en medio sólido y qPCR en plantas de cítricos tratadas con agua: resultados expresados como log bacteria/cm² para los distintos tiempos luego de la inoculación con *Xcc*. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas por tratamiento y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos según el test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

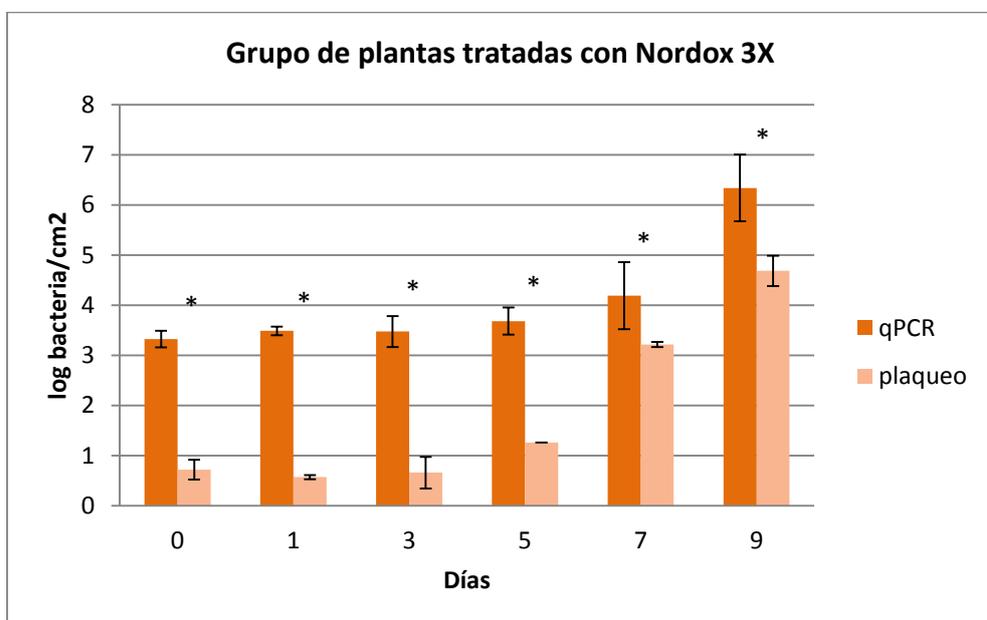


Figura 25. Cuantificación de *Xcc* por crecimiento en medio sólido y qPCR en plantas de cítricos tratadas con cobre (Nordox 3X): resultados expresados como log bacteria/cm² para los distintos tiempos luego de la inoculación con *Xcc*. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas por tratamiento y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos según el test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Se puede observar un mayor número de bacterias cuando se cuantifica por la técnica de qPCR, en ambos tratamientos. Es importante tener en cuenta que la técnica de qPCR no solo detecta bacterias vivas-cultivables, sino que también detecta bacterias vivas-no cultivables y bacterias muertas.

En el caso de las plantas tratadas con agua, según el test estadístico Kruskal-Wallis se observa una diferencia significativa entre ambas metodologías en los días 0, 1 y 3 (figura 24). Por otro lado, para las plantas que fueron tratadas con Nordox 3X la diferencia entre ambos tratamientos es mayor y se mantiene en todos los tiempos (figura 25).

5.3 - Análisis de la inducción del estado VBNC de Xcc en plantas de cítricos tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.

En función de los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento, donde se observó que bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X no crecen en medio sólido, se evaluó si este resultado se debe a la inducción del estado VBNC o la muerte de la bacteria por este compuesto dentro del tejido vegetal. Para ello, se determinó la cantidad de bacterias totales, vivas, y muertas por citometría de flujo (figura 26) y la cantidad de bacteria cultivable por crecimiento en medio sólido a los 5 y 7 días. A partir de los resultados obtenidos se calculó el % de bacterias VBNC, como la diferencia entre vivas y cultivables.

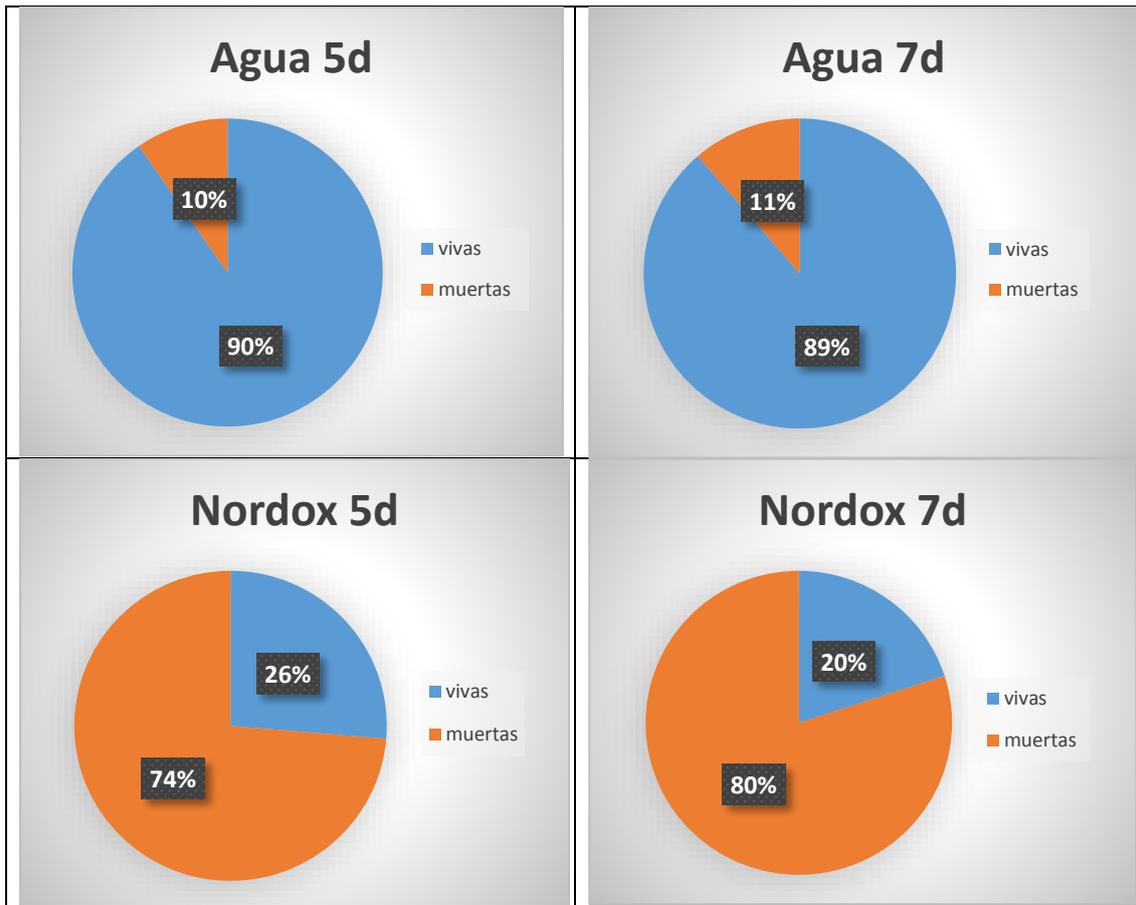


Figura 26. Determinación por citometría de flujo de la proporción de bacterias vivas y muertas recuperadas a partir de plantas de cítricos tratadas con agua y Nordox 3X a los 5 y 7 días posteriores a la inoculación con Xcc.

En las bacterias recuperadas de plantas tratadas con agua (grupo control) existe un alto porcentaje de bacterias vivas. Por el contrario, la población recuperada de plantas tratadas con Nordox 3X contiene un alto porcentaje de bacterias muertas, evaluado por la incorporación de yoduro de propidio a las células. Estas diferencias se observan tanto a los 5 como a los 7 días posteriores a la inoculación.

En la figura 27 se muestra la gráfica con los resultados de VBNC presentes en las muestras correspondiente al día 5, calculado como la diferencia entre bacterias vivas y cultivables.

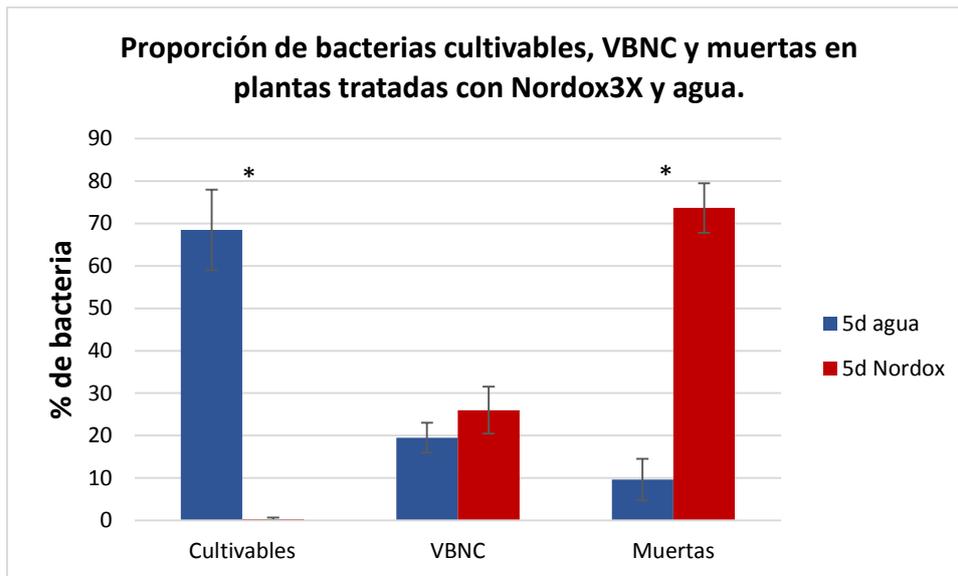


Figura 27. Evaluación del porcentaje de bacterias cultivables, VBNC y muertas recuperadas a partir de plantas de cítricos tratadas con agua y Nordox 3X a los 5 días posteriores a la inoculación con Xcc. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas por tratamiento y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (t-test, $p < 0.05$).

Luego de 5 días de la inoculación con Xcc, se observó una drástica disminución en la proporción de bacterias cultivables recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X en relación a las obtenidas a partir de plantas tratadas con agua. Concomitentemente, en las plantas tratadas con Nordox 3X, aumentó significativamente la proporción de células muertas. A pesar de estos cambios, la proporción de bacterias VBNC se mantuvo relativamente constante para ambos tratamientos. Aparentemente, el Nordox 3X no aumentaría la proporción de bacterias en estado VBNC, y tendría un efecto bactericida dentro del tejido vegetal. En el Apéndice 3, tabla 7, se detallan los % de bacterias cultivables, VBNC y muertas para la 3 repeticiones biológicas.

También se evaluó la evolución de la proporción de células de Xcc que entraron en estado VBNC en plantas tratadas con **Nordox 3X** a los 7 días luego de inoculación, para determinar si dicha población aumenta en el tiempo, permanece constante o disminuye (figura 28). En el Apéndice 3, tabla 8 se detalla la proporción obtenida de cultivables, VBNC y muertas para las 3 repeticiones biológicas.

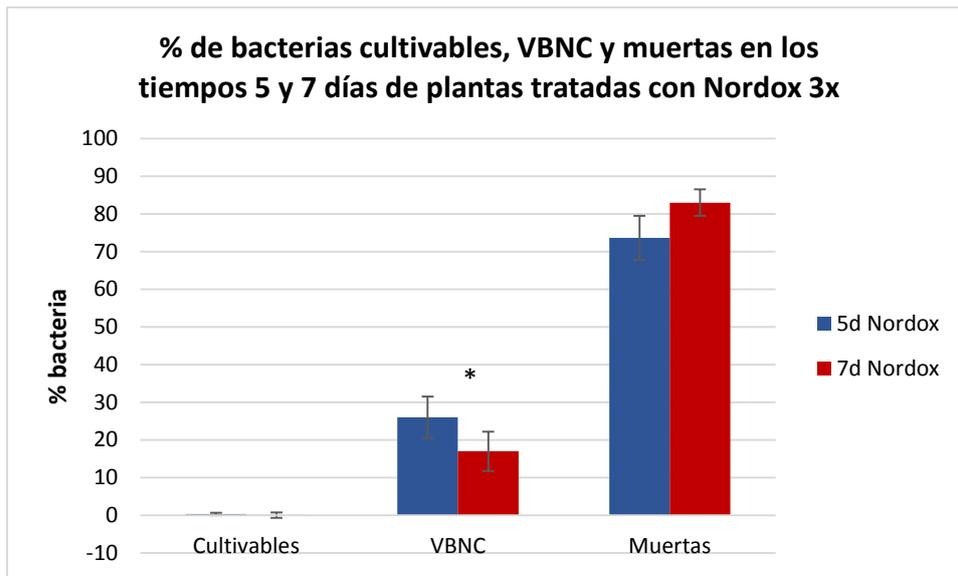


Figura 28. Evaluación del porcentaje de bacterias cultivables, VBNC y muertas recuperadas a partir de plantas de cítricos tratadas con Nordox 3X a los 5 y 7 días posteriores a la inoculación con Xcc. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas por tratamiento y las barras el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (t-test, $p < 0.05$).

En los resultados del % de bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X se observa una disminución significativa en la proporción de bacterias VBNC a los 7 días. Por otro lado, se aprecia un ligero aumento de las bacterias muertas y cultivables, aunque estos no fueron significativos. Esto sugiere, nuevamente, que el cobre no induce el estado de VBNC y que con el tiempo las VBNC tenderían a morir, o volver al estado cultivable.

En el apéndice 3, figura 7, se muestran los gráficos característicos obtenidos por citometría de flujo.

5.3.1 - Limitante de la citometría de flujo para la detección y cuantificación de la cepa Xcc-GFP

La cepa Xcc-GFP utilizada, es portadora del plásmido pMP2444 que carga la secuencia del gen *gfp* (Stuurman et al., 2000). Más allá de los marcadores de selección a utilizar en los medios de cultivo para mantener el plásmido (antibióticos ampicilina 100 µg/ml y gentamicina 10 µg/ml), según Rigano et al. (2007) se trata de una transformación con alta estabilidad. En los ensayos realizados con la cepa Xcc-GFP no se utilizaron medios de cultivos suplementados con antibióticos, con el fin de minimizar el impacto del mismo sobre el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, se observó por citometría que existe un porcentaje de bacterias Xcc que no se comporta como las bacterias transformadas con el plásmido *gfp* y por lo tanto, no pueden ser cuantificadas. Además, en las placas con medio NB utilizadas para la cuantificación se observan

dos tipos de colonias, la colonia Xcc-GFP y la colonia típica de Xcc-WT, ésta última presente en un 8% - 16% (figura 29). Cada una de estas colonias fue observada por el microscopio confocal para detectar, o no, la presencia de fluorescencia. Se pudo observar que las colonias Xcc-GFP típicas fluorescen en verde, debido a la presencia de la proteína GFP (figura 29b), mientras que en la preparación de las bacterias Xcc-WT no se pudo detectar fluorescencia. Esto indicaría que en la población presente dentro del tejido vegetal existe un % de bacterias que pierden la fluorescencia. A partir de estas observaciones, los datos obtenidos por citometría fueron corregidos con el % de Xcc-WT obtenido en el crecimiento en medio NB, para cada una de las muestras.

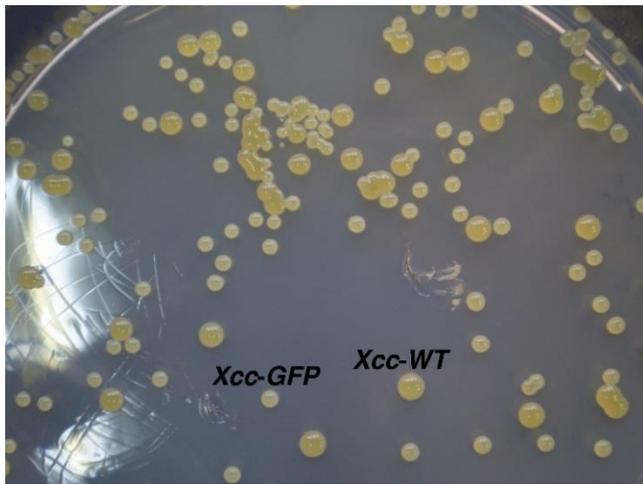


Figura 29a. Colonias Xcc-GFP y Xcc-WT que aparecen.

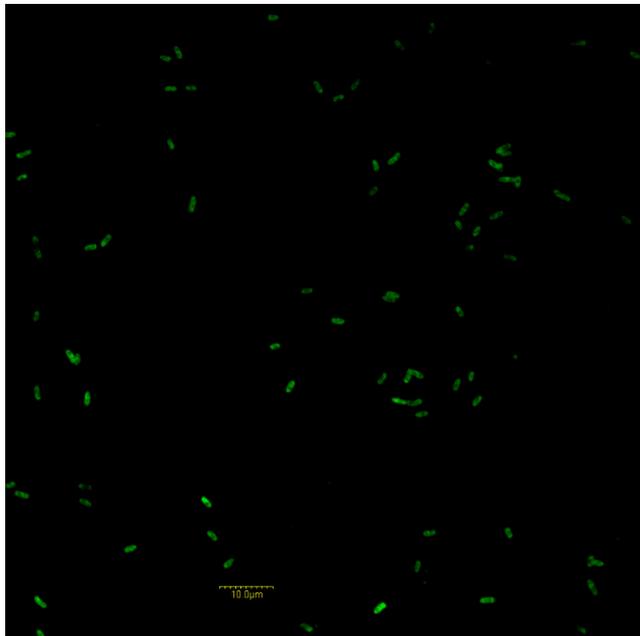


Figura 29b. Bacterias fluorescentes obtenidas de la colonia Xcc-GFP, observadas al microscopio confocal con un aumento de 120x.

5.3.2 - Controles de la técnica

Para el análisis por citometría de flujo se realizaron dos controles:

1) *Presencia de la bacteria Xcc-GFP en la muestra:*

Para ambos tiempos de muestreo, día 5 y 7, se corroboró que la detección de fluorescencia obtenida por citometría correspondiera a bacteria Xcc-GFP presente en la muestra y no a artefactos de la técnica o partículas fluorescentes provenientes del tejido vegetal. Para ello se observó al microscopio confocal una alícuota de la muestra previamente al análisis por citometría (figura 30).

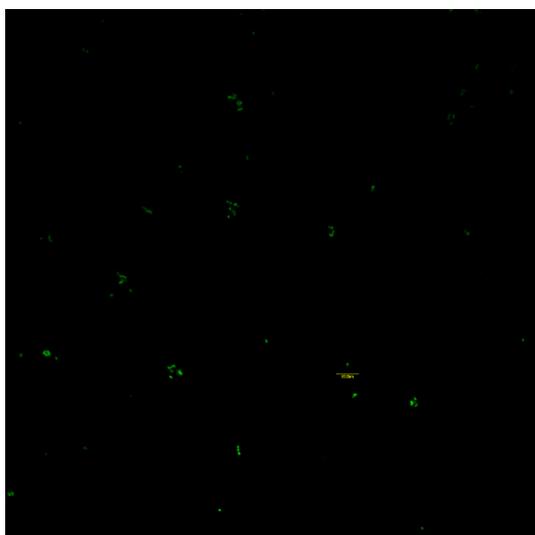


Figura 30. Bacterias Xcc-GFP recuperadas de plantas control y observadas por microscopio confocal con un aumento de 60x.

La observación al microscopio muestra la presencia de partículas del tamaño de las bacterias, presente en la muestra luego del proceso de exudación, las que pueden ser detectadas por citometría de flujo. Las bacterias Xcc son muy pequeñas, midiendo alrededor de 1 μ m.

2) *Controles negativos:*

En cada uno de los días de recuperación de la bacteria se evaluó un control negativo. Dicho control es un grupo de hojas de pomelo que no se inocularon con Xcc-GFP. Los valores de fluorescencia obtenidos no son significativos comparado con las muestras inoculadas, considerándose artefactos de la técnica. En el apéndice 3, figura 8, se muestran los gráficos de citometría obtenidos.

5.4 - Expresión diferencial de genes de Xcc relacionados con la patogenicidad de la bacteria en plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua

5.4.1 - Cálculo de la eficiencia de amplificación

Se determinó la eficiencia de amplificación de los genes seleccionados para los análisis de expresión a partir de la construcción de una curva con diluciones seriadas de plásmidos que tienen clonado cada fragmento de interés. En el apéndice 4, figura 9 y 10, se muestran las gráficas de eficiencia para cada uno de los genes, las curvas de cuantificación y las gráficas de *melting* correspondientes.

Las eficiencias obtenidas fueron cercanas a 1 y similares entre sí, encontrándose entre 0.96 y 1.05. La única excepción es para el gen *avrXacE1* que tiene una eficiencia más baja, de 0.82. Como se mostró anteriormente (figura 21), la eficiencia de los cebadores para el gen *Irp*, utilizado como el gen de referencia, es de 0.96, similar a la del resto de los genes.

5.4.2 - Controles de qPCR

Para realizar los controles necesarios para el análisis de la expresión relativa de los genes de patogenicidad de Xcc se utilizó ARN de bacterias exudadas el día 7 post-inoculación de plantas tratadas con agua. La concentración de ARN obtenida fue de 30 ng/μl. Para el tratamiento con DNasa I, se utilizó 37,2 ng total de ARN en un volumen final de 15μl (la cantidad de ARN utilizada es la misma que se utiliza para el análisis de expresión de las muestras en ambos tratamientos para los diferentes tiempos).

Los controles realizados incluyen: **A)** ARN tratado con DNasa I y con retrotranscripción (ARN c/DNasa I y c/RT), **B)** ARN tratado con DNasa I y sin retrotranscripción (ARN c/DNasa I y s/RT), **C)** ARN sin tratar con DNasa I y con retrotranscripción (ARN s/DNasa I y c/RT) y, **D)** ARN sin tratar con DNasa I y sin retrotranscripción (ARN s/DNasa I y s/RT) (figura 31, tabla 16).

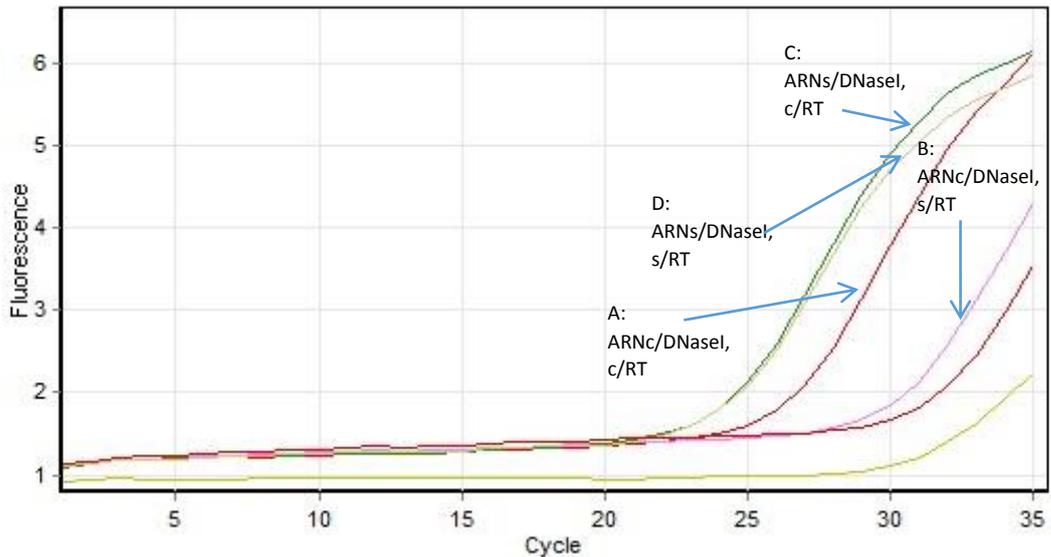


Figura 31. Curvas de amplificación de los controles de qPCR.

Tabla 14. Cts obtenidos de los diferentes controles de qPCR.

Código	Muestra	Ct
■	1A ARNc/tratDNase y c/RT puro	23,22
■	1B ARNc/tratDNase y s/RT puro	27,44
■	1C ARNs/tratDNase y c/RT puro	21,06
■	1D ARNs/tratDNase y s/RT puro	21,33
■	blanco trabajo	28,98
■	blanco reactivos	28,66

A continuación se muestra la curva de *melting* para evaluar la especificidad de los productos obtenidos. Las muestras presentan un pico en 89.2 y 89.3 (figura 32).

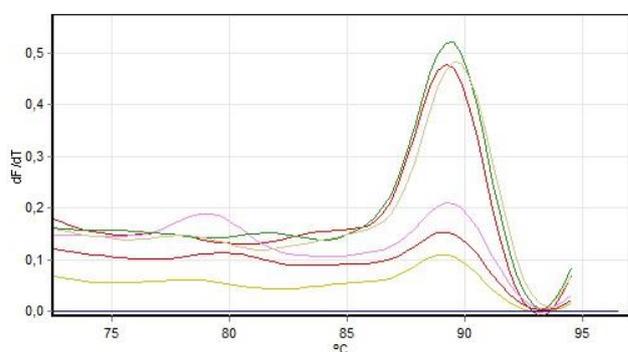


Figura 32. Curvas de *melting* de los controles de qPCR.

Los controles del qPCR fueron tratados de la misma manera que las muestras utilizadas para el estudio de expresión de genes de patogenicidad de *Xcc in planta*.

El **control A** es el ARN tratado con DNasa I y seguido de una retrotranscripción (RT). Constituye la muestra de referencia ya que recibe el mismo tratamiento que las muestras sobre las cuales evaluamos la expresión génica de Xcc.

Con el **control B** se evalúa si el tratamiento con DNasa I fue efectivo. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con la enzima elimina el ADN presente en la muestra, no observándose amplificación. La curva obtenida está en la misma zona que el blanco.

Con el **control C** se evalúan 2 factores: 1) si el tratamiento con DNasa I inhibe la reacción de PCR; 2) cuánto afecta a la amplificación la presencia de ADN genómico. En el primer caso se podría decir que la enzima, aparentemente no inhibe la reacción, ya que las curvas en donde hay tratamiento (A) y en donde no hay (C) tienen la misma forma. Por otro lado, se constata que la muestra que no es tratada con DNasa I tiene una gran cantidad de ADN genómico, aproximadamente un orden más que la muestra tratada.

El **control D** no tiene tratamiento con DNasa I, y no tiene retrotranscripción, por lo tanto, la amplificación observada es debido a la presencia de ADN genómico. El Ct de la muestra D es muy similar a la muestra C (sin tratamiento y con RT). En función de estos resultados se podría inferir que las muestras de ARN tienen un alto porcentaje de ADN genómico, y que la síntesis de cDNA no aporta mucho más molde para la reacción de PCR.

Con el fin de verificar si hay inhibición en las muestras, se realizaron diluciones para ver si dicha inhibición se levanta en algún punto. Las diluciones que se realizaron fueron: puro, 1/2, 1/4 y 1/8 (apéndice 4, figura 11). Los resultados obtenidos sugieren que no existe inhibición de la muestra pura, ya que no hay cambio en la forma de la curva, y en las sucesivas diluciones las curvas obtenidas aparecen en ciclos posteriores.

5.4.3 - Análisis de la expresión relativa de genes de patogenicidad de Xcc

Para los ensayos de expresión se inoculó una población de 1.2×10^6 ufc/ml en hojas de pomelo, y se recuperó en los tiempos 1, 3, 5 y 7 días. Se realizó una extracción de ARN y se cuantificó la cantidad obtenida por espectrofotometría utilizando el *Nanodrop1000 Spectrophotometer* (Thermoscientific) (Apéndice 4, tabla 9).

Para el tratamiento con DNasa I se puso la mayor cantidad de ARN posible en la reacción, tomando como referencia la muestra que tiene menor concentración de ARN. En este caso fue 37.2ng de ARN por reacción, en un volumen final de 15 μ l. La efectividad del tratamiento con DNasa I fue evaluada por la amplificación de una región del gen ribosomal 16S en una reacción

de PCR en tiempo final (apéndice 4, figura 12). Se pudo observar que el tratamiento es efectivo, no observándose amplificación en ninguna de las muestras tratadas con la enzima.

En el análisis de expresión se evaluaron, para cada gen, todos los tiempos de muestreo. Se utilizó como muestra calibradora el exudado de plantas tratadas con agua y como gen de referencia el *lrp*. Para calcular la expresión relativa se aplicó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Los resultados obtenidos se interpretaron según los siguientes criterios:

$2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$, mayor expresión de gen x en Xcc recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3x respecto al control.

$2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$, menor expresión del gen x en Xcc recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3x, respecto al control.

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ no hay cambios de expresión entre ambos tratamientos.

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos de expresión relativa, utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En el Apéndice 4, tabla 10, se muestran los valores de cuantificación relativa para cada una de las repeticiones biológicas.

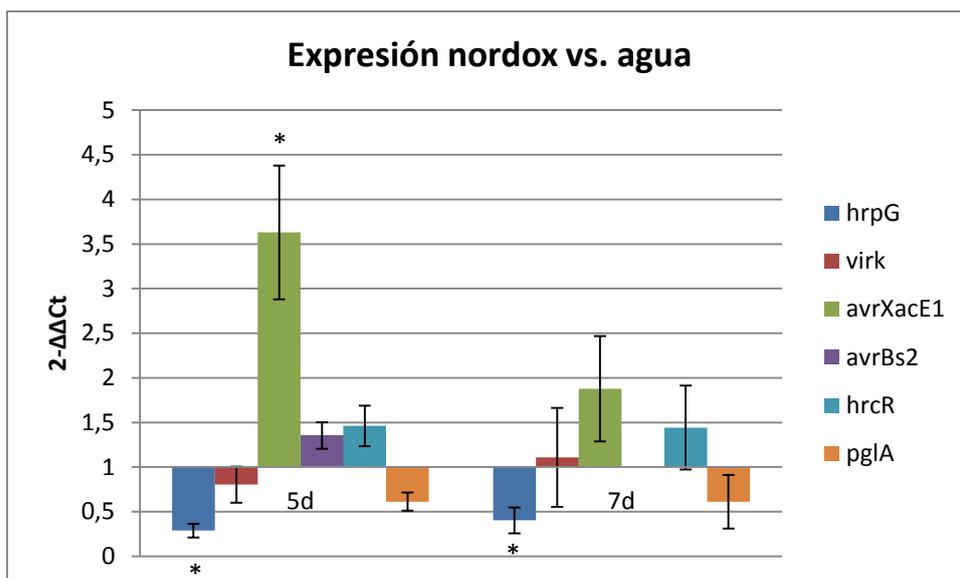


Figura 33. Expresión relativa de los diferentes genes de patogenicidad de Xcc en plantas de pomelo tratadas con Nordox 3X respecto a la expresión de Xcc en plantas tratadas con agua. Se muestran los valores de expresión relativa a los de 5 y 7 días posteriores a la inoculación. Las barras de error representan el error estándar de cada muestra. Los asteriscos indican los genes que mostraron diferencias significativas de expresión entre los tratamientos (t-test, $p < 0.05$). No se pudo analizar el gen *avrBs2* en el día 7 porque no se obtuvieron las repeticiones necesarias para el análisis estadístico.

En función de los resultados obtenidos los tiempos 1d y 3d fueron eliminados del análisis, ya que tienen una expresión muy baja, estando el Ct muy cercano al blanco. Cuando los Ct de las muestras son similares o mayores al Ct del blanco, los resultados no son confiables. Por lo tanto para este estudio se tomaron en cuenta solo los tiempos 5d y 7d.

Se observa una diferencia significativa de expresión en los genes *hrpG* y *avrXacE1*. El gen *hrpG* disminuye su expresión en bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X en los días 5 y 7. Por otro lado, el gen *avrXacE1* aumenta su expresión en plantas con Nordox 3X, en el día 5 post-inoculación.

En forma general, se puede observar para los tiempos 5d y 7d una tendencia de que los genes *hrpG*, *virk* y *pglA* tengan una menor expresión en las plantas con Nordox 3X y que los genes *avrXacE1*, *avrBs2* y *hrcR* tengan un ligero aumento de expresión en plantas tratadas con Nordox 3X. Cabe destacar, que la expresión del gen *hrpG* se ve claramente afectada en las plantas tratadas con Nordox 3X.

4.7 - Determinación de los cambios en la expresión de genes de patogenicidad en células de Xcc que entraron en estado VBNC, luego del tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en ensayos *in vitro*.

Se analizó la expresión de los genes de patogenicidad *hrpG*, *virK*, *avrXacE1*, *avrBs2*, *hrcR* y *pglA* en una población de Xcc tratada con $135\mu\text{M}$ de CuSO_4 , en un ensayo *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, trabajos previos demostraron que el tratamiento con CuSO_4 durante 10 minutos induce el estado VBNC en Xcc y que dichas células inoculadas en planta de pomelo producen síntomas (del Campo et al., 2009). Sería interesante analizar el efecto de este estado sobre la expresión de dichos genes, con el fin de profundizar un poco más sobre los genes que pueden estar participando en el estado de viable pero no cultivable.

De los resultados de crecimiento en medio NB e inoculación en plantas de pomelo se confirma la ausencia de bacterias cultivables y la inducción de síntomas, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados fueron previamente confirmados en el trabajo de del Campo et al., 2009. En la tabla 15 y figura 34 se muestran los resultados de cuantificación relativa por qPCR, aplicando la metodología $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Dichos resultados provienen de 3 réplicas biológicas.

En el apéndice 5, se muestra el análisis de tratamiento con DNasa I y las gráficas de cuantificación de qPCR y melting obtenidas (figura 13, 14 y 15; tabla 11 y 12).

Tabla 15. Resultados de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para las 3 réplicas biológicas.

Genes	rep1	rep2	rep3	promedio	desvío
	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$				
<i>virK</i>	0,52485834	0,43226862	1,14076372	0,69929689	0,22234578
<i>hrpG</i>	0,12586944	0,61132014	2,4794154	1,07220166	0,71742676
<i>avrXacE1</i>	0,20732989	ND	0,01260378	0,10996683	0,09736305
<i>avrBs2</i>	0,21168633	0,25702846	0,55864357	0,34245278	0,10888498
<i>hrcR</i>	0,12674493	0,50347778	0,85856544	0,49626272	0,21128918
<i>pglA</i>	0,27357343	0,06425711	0,52485834	0,28756296	0,13314798

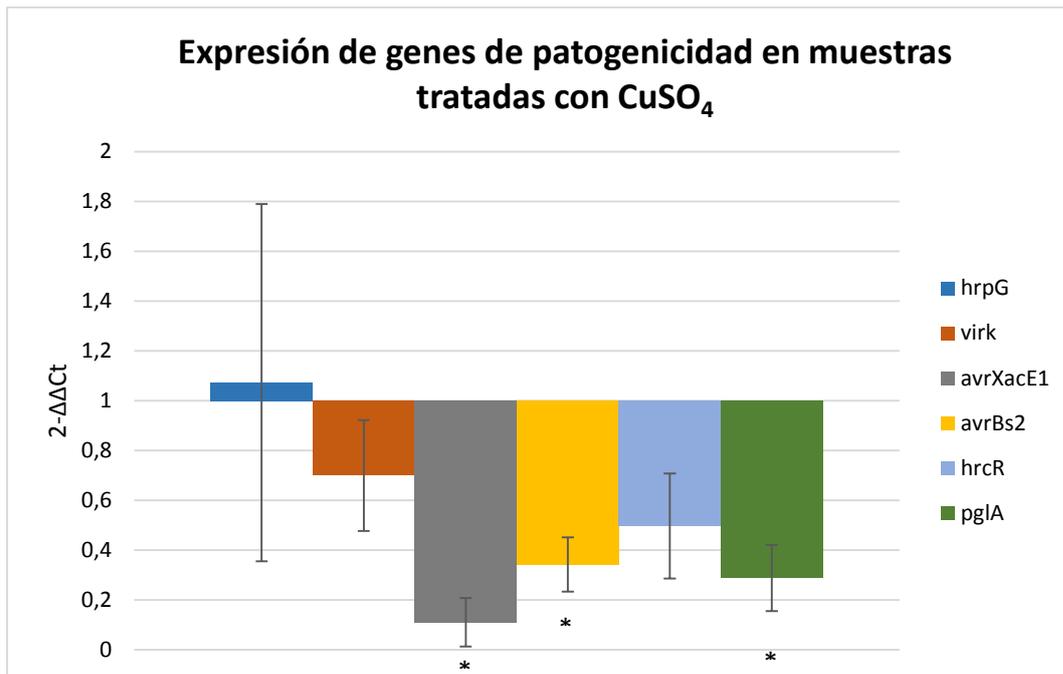


Figura 34. Grafica de expresión relativa de genes de patogenicidad en Xcc tratadas con CuSO₄.

Los resultados obtenidos muestran una tendencia de los genes analizados a disminuir su expresión en las bacterias tratadas con CuSO₄, pero solo se obtuvieron diferencias significativas en los genes *avrXacE1*, *avrBs2* y *pgIA*.

6 - DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción de compuestos a base de cobre, utilizando como modelo el agroquímico de óxido cuproso, Nordox 3X. Si bien estos compuestos tienen un efecto bactericida sobre la superficie de la hoja (Leite et al., 1987; Graham et al., 2004, Canteros, 2004; Schubert y Sun, 2003; Goto, 1992), resultados obtenidos en nuestro laboratorio, y por otros investigadores (Stall et al., 2002) sugieren que, además del efecto bactericida, podría tener otras formas de actuar, que en conjunto explicarían el razonable control del cancro cítrico logrado en el campo.

En base a estas observaciones se plantearon dos hipótesis: 1) el cobre afectaría la multiplicación de la bacteria, lo cual provocaría la disminución de la población. Como consecuencia habría menor cantidad de factores de virulencia o no se llegaría al umbral necesario para causar enfermedad, 2) el cobre inhibiría, o afectaría, la expresión de determinados genes de patogenicidad que son responsables de la inducción y desarrollo de síntomas.

Efecto del Cu⁺⁺ sobre la multiplicación de Xcc en planta

Se realizaron curvas de crecimiento bacteriano dentro del tejido vegetal en dos condiciones de tratamiento: plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua. La cuantificación de la bacteria en cada tiempo se realizó por dos metodologías: crecimiento en medio sólido y cuantificación absoluta por qPCR.

Para las **plantas tratadas con Nordox 3X** se pudo observar que la cuantificación por qPCR arroja entre 1 y 2 órdenes más de células bacterianas que la cuantificación en placa (figura 25). Es un resultado esperado, ya que cada metodología detecta fracciones diferentes de células dentro de una población bacteriana: el crecimiento en medio sólido detecta aquellas bacterias que tengan la capacidad de dividirse y formar colonias, y la cuantificación por qPCR además de las células cultivables, detecta también células vivas-no cultivables (VBNC), células muertas y ADN extracelular liberado de células degradadas.

En el caso de las **plantas tratadas con agua** es importante observar que existen dos fases en la curva de crecimiento: una primera fase en la cual se observa diferencia de cuantificación entre crecimiento en medio sólido y qPCR; y una segunda fase donde no hay diferencias significativas entre ambos métodos (figura 24). Probablemente, durante los primeros días de crecimiento en la planta las bacterias se deban adaptar a un entorno que tiene baja concentración de nutrientes

y presencia de compuestos tóxicos. Junto con esto, la bacteria debe superar la defensa primaria de la planta. Esto hace que, independientemente de la aplicación de algún agroquímico, una parte de la población bacteriana muera, o entre en un estado VBNC, por lo cual la cantidad de bacteria cuantificada por placa es menor. Una vez superado este periodo de adaptación, la bacteria entraría a la segunda fase donde superaría esta barrera primaria de defensas vegetales y habría un alto porcentaje de bacteria viva-cultivable (Jones y Dangl, 2006).

Otra posible explicación de la mayor cantidad de bacterias detectadas por qPCR, es la presencia de más de un genoma por bacteria, principalmente en la fase de crecimiento exponencial, como ha sido constatado por Adachi et al. (2008). En el trabajo de Button y Robertson (2001) se observó que cierto grupo de bacterias bajo condiciones de desnutrición presentan más de un genoma, aunque este comportamiento depende de la especie bacteriana (Reichert-Schwillinsky et al., 2009).

Según los resultados obtenidos, se podría inferir que cuando la bacteria está en condiciones de crecimiento favorable, como es el caso de los tiempos más tardíos de las plantas tratadas con agua, no hay diferencia significativa entre la cuantificación por crecimiento en medio sólido y la cuantificación por qPCR, ya que la mayoría de la bacteria presente es cultivable. Estos resultados ya fueron observados en un trabajo realizado por Reichert-Schwillinsky et al. (2009) donde se evaluó el crecimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes* frente a condiciones de crecimiento óptimo y frente a estrés, utilizando qPCR y crecimiento en placa. Por otro lado, cuando la bacteria está en un ambiente estresante, como son los primeros tiempos en las plantas tratadas con agua y todos los tiempos analizados en las plantas tratadas con cobre, se observa una menor cantidad de bacteria cuando se utiliza el crecimiento en medio sólido. La presencia de menor cantidad de bacteria puede deberse a la muerte o a la inducción del estado VBNC debido a la interacción inicial con el hospedero.

En el caso de las plantas tratadas con Nordox 3X se podría concluir que este agroquímico a base de cobre (óxido cuproso) tiene un impacto sobre la bacteria dentro del tejido vegetal, disminuyendo la culturabilidad de la misma (figura 19).

Inducción del estado VBNC

El siguiente aspecto que se evaluó fue determinar si la disminución de la culturabilidad se debe a la muerte de la bacteria o a la entrada al estado VBNC.

El estado VBNC de las bacterias es un tema que ha generado controversias basadas principalmente en dos puntos de vistas. Muchos autores consideran que es un estado que precede a la muerte de la bacteria, mientras que otros consideran que podría tener un rol

importante en el ciclo de vida de la bacteria, o como estrategia de defensa frente a diferentes estreses ambientales (Oliver, 2010, Nyström, 2005; Barcina y Arana, 2009). En el trabajo de Sachidanandham y Yew-Hoong Gin (2009) se observó que cultivos estresados presentan heterogeneidad celular (asincronía en el ciclo celular y subpoblaciones). Esta heterogeneidad ayuda a la bacteria a explotar nuevos nichos ofreciendo distintas ventajas de supervivencia. Existen antecedentes que, en bacterias que no forman esporas, la heterogeneidad fenotípica no es un compromiso irreversible, permitiendo una rápida reversión al fenotipo original cuando las condiciones apropiadas son restauradas (Thattai y van-Qudenaarden, 2004; Kussell y Leibler, 2005). Este podría ser el comportamiento de las VBNC, las cuales serían un reservorio de patógenos en el ambiente. Muchos estudios epidemiológicos o de diagnóstico de bacterias patógenas de plantas se basan en el recuento en placa, por lo cual, si la bacteria está en estado VBNC no sería detectada y se subestimaría la población real y potencialmente peligrosa del fitopatógeno (Barcina, 2009).

Existen antecedentes de que el cobre induce la entrada al estado VBNC en distintas bacterias (Alexander et al., 1999, Ghezzi y Steck, 1999; Grey y Steck, 2001). En *E. amylovora* la inducción de este estado es una estrategia de supervivencia frente al metal y una vez eliminada la fuente de estrés “resucita” y mantiene su virulencia (Ordax, et al., 2006). Este fenómeno ya ha sido reportado en *Xcc*. Cuando una población de *Xcc* es tratada con una concentración de CuSO_4 , en ensayos *in vitro*, entra en estado VBNC. Sin embargo, cuando estas células son inoculadas en plantas de pomelo producen enfermedad, lo que demuestra que las bacterias en el estado VBNC no pierden la virulencia (del Campo et al., 2009). En el trabajo de Golmohammadi et al. (2013) se demostró que el estado de VBNC en *Xcc*, inducido por falta de nutrientes o la exposición a bajas concentraciones de cobre, se mantiene mientras hay condiciones adversas, pero revierte cuando se eliminan los factores de estrés.

Los resultados obtenidos muestran que la menor cantidad de bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X se debe a un aumento de bacterias muertas y no a la inducción del estado VBNC (figura 26). Dentro de la población de células vivas cuantificadas por citometría, se determinó la proporción de VBNC presentes, tanto de la población recuperada del grupo control, como de la población recuperada de plantas tratadas con Nordox 3X. Se observó que en ambos grupos de plantas no hay diferencias significativas del porcentaje de VBNC (figura 27). A partir de estos resultados se pueden inferir dos conclusiones: 1) dentro de la población bacteriana, independientemente al tratamiento, existiría un pequeño grupo de bacterias que se

encuentran en ese estado VBNC, 2) el compuesto a base de cobre, Nordox 3X, no induciría el estado VBNC dentro del tejido vegetal.

Cuando se analizó el porcentaje de VBNC a los 5 y 7 días post-inoculación en plantas tratadas con Nordox 3X, se observó que la proporción de estas bacterias disminuye con el tiempo. Por otro lado se observó un ligero aumento de bacterias muertas y cultivables. Esto sugiere que el estado VBNC podría ser parte del ciclo de vida de la bacteria, y con el tiempo tenderían a morir, o a volver al estado de cultivable (figura 28). Como se mencionó anteriormente existen dos puntos de vista con respecto a la existencia de las VBNC. En uno se consideran que las VBNC es un estado previo a la muerte y en el otro que, dicho estado es una estrategia de sobrevivencia (Oliver, 2010, Nyström, 2005; Barcina y Arana, 2009). Los resultados obtenidos sugieren que ambas teorías serían válidas, siendo necesario el análisis de un mayor número de muestras para lograr una significancia estadística en los resultados.

Según la teoría de Epstein (2009) en una población bacteriana que crece en condiciones óptimas, existiría un número de células que naturalmente se encuentran en un estado “durmiente”, estado inducido por eventos poco frecuentes y al azar, tales como cambios en la expresión de los principales genes regulatorios. Cuando se enfrentan a un estrés, más células son inducidas a pasar al estado inactivo. Si las condiciones adversas persisten, las células comienzan a morir. Sin embargo, si el ambiente que las rodea se torna favorable, un grupo de células comienzan a “despertar” al resto de la población. Esta subpoblación de células que se comporta de esta manera, denominadas “células scouts”, muchas veces no es detectada por técnicas microbiológicas que evalúan crecimiento, o son consideradas muertas. Además, la supervivencia de este grupo de células al sistema inmune del hospedero y a los diferentes tratamientos, explicaría la recurrencia, o falta de control de ciertas enfermedades.

En el caso particular del patosistema Xcc-cítricos, se podría inferir que en dicha interacción existe un número de células bacterianas que se encuentran en estado VBNC. Probablemente, una pequeña fracción de este grupo de VBNC ya exista de forma natural en la población, como parte del ciclo de la bacteria previo a la muerte, o como un grupo que tiene una función específica de “explorar” el ambiente que las rodea. En el caso de las plantas control, es probable que el contacto de la bacteria con la misma provoque un aumento de la población de VBNC, como mecanismo de sobrevivencia frente a la respuesta de defensa del hospedero. Cuando la bacteria está en contacto con plantas tratadas con cobre, se observa un gran aumento de bacterias muertas, pero no hay cambios significativos en la población de VBNC, sugiriendo que el cobre no participa en la inducción de este estado dentro de la planta. En función de la teoría de Epstein, se podría pensar que en plantas tratadas con cobre la población de VBNC tendería a morir si el

entorno no vuelve a ser favorable. Para confirmar esta hipótesis sería necesario evaluar la dinámica de las VBNC en tiempos posteriores a los 7 días.

Cabe destacar que los trabajos citados sobre la inducción del estado VBNC fueron realizados en ensayos *in vitro*, mientras que la presente tesis es el primero que estudia la presencia de bacterias VBNC *in planta*, utilizando la citometría de flujo como técnica de análisis.

Expresión de genes de patogenicidad en bacterias en contacto con plantas tratadas Nordox3X

Para el análisis de expresión se inoculó una población de Xcc en dos grupos de plantas: plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua. Posteriormente, se exudó la población bacteriana del tejido vegetal y se evaluó la expresión de genes de patogenicidad de Xcc en ambos tratamientos. El análisis estadístico muestra diferencia significativa en los genes *hrpG* y *avrXacE1*. El gen *hrpG* presenta una disminución de expresión en bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X, en los días 5 y 7, mientras que el gen *avrXacE1* tiene mayor expresión en la evaluación del quinto día solamente. Para el resto de los genes no se observa diferencias significativas de expresión, sin embargo se pueden ver tendencias en los genes *virk* y *pglA* a disminuir su expresión, y los genes *avrBs2* y *hrcR*, a aumentarla (figura 33).

Como se comentó anteriormente, la proteína **HrpG** regula el cluster *hrp* a través de la proteína HrpX. El cluster *hrp* codifica genes que forman el sistema de secreción tipo III (SST3), que es responsable de la secreción de factores de virulencia, denominados efectores tipo III (Dunger et al., 2005; Guo et al., 2011). Además, se constató en los trabajos de Yamazaki et al. (2008) y Guo et al. (2011) que la proteína HrpG induce la expresión de los genes ***pglA*** y ***virk***, cuyos productos son sustratos del sistema de secreción tipo II (SST2). Los resultados obtenidos en nuestra tesis son concordantes con esto, ya que una disminución en la expresión de *hrpG*, tendería a disminuir la expresión de los genes *virk* y *pglA*.

Por otro lado, las proteínas **AvrXacE1** y **AvrBs2** son efectores tipo III, por lo cual se esperaría que su expresión sea menor al disminuir la expresión del gen *hrpG*. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran lo contrario. El gen *avrXacE1* mostró un aumento significativo de expresión en el día 5 y tendió a aumentar en el día 7 en bacterias recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X. Lo mismo ocurrió para el gen *avrBs2*. Esto sugiere que existen otros mecanismos que regularían su expresión, independientes de *hrpG*. En el trabajo de Guo et al. (2012) se observó que el gen *avrXacE1* y otros genes del SST3 (*hrcC*, *hrcJ*, *hrpB1*, *hrpB2*, *hrpB4*, *hrpB5*, *hpa1* y *hpaB*) son regulados de forma positiva por la proteína RpfG. Esta proteína forma parte del sistema de

dos componentes RpfC/RpfG, sistema que participa en la transducción y percepción de la familia de moléculas señal DSF (*diffusible signal factor*). El sensor kinasa RpfC interactúa con RpfF para controlar la producción de DSF y alcanzar el umbral de concentración necesario en el ambiente extracelular. Las señales DSF captadas por RpfC son transferidas al regulador RpfG por un mecanismo de fosforilación. El RpfG activado modula la concentración fisiológica del segundo mensajero c-di-GMP. Altos niveles de c-di-GMP promueven la formación de biofilm, mientras que bajos niveles promueven la motilidad y la transcripción de factores de virulencia (Romling et al., 2005; Li et al., 2011b). En estudios previos se observó que el regulón *rpfG* es reprimido por HrpG (Guo et al., 2011). Se podría concluir que cuando *hrpG* se está expresando, promueve la expresión del cluster de genes *hrp* y efectores tipo III, e inhibe la expresión de *rpfG*. Cuando su expresión es reprimida, por ejemplo debido al Cu⁺⁺, aumenta la expresión del *rpfG*, el cual comienza a regular de forma positiva la expresión del translocón SST3 y algunas de sus proteínas efectoras, entre las que se encuentra AvrXacE1. Además, en el trabajo de Guo et al. (2011) se observó que 58 genes, entre los que se encuentran genes de patogenicidad, son regulados por la proteína HrpX de manera independiente a la proteína HrpG. En *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* se observó que la proteína Zur regula de forma positiva los genes del cluster *hrp* por medio de la proteína HrpX. La proteína Zur es clave en la homeostasis del zinc y participa en la virulencia de la bacteria (Huang, 2009). En Xcc podría existir una proteína homóloga a Zur que regule HrpX de forma independiente a *hrpG*.

La proteína HrpG es un regulador principal del proceso de patogénesis. La bacteria a través de los regulones HrpG y HrpX regula múltiples procesos metabólicos dentro del tejido vegetal, tales como biosíntesis de aminoácidos, fosforilación oxidativa, vía de las pentosa fosfato, transporte de azúcares, hierro, potasio y compuestos fenólicos, que ayudan a la bacteria a superar el estrés ambiental. La activación de transportadores de azúcar permite la captación de sacarosa, glucosa y fructuosa como fuentes de carbono y energía, azúcares frecuentes en el apoplasto de la planta. La activación de las vías de los compuestos fenólicos permite transformar compuestos tóxicos presentes en la planta en compuestos menos tóxicos (Guo et al., 2011). En el trabajo de Guo et al. (2011) se observó que los mutantes *hrpG* y *hrpX* de Xcc expresan diferentes genes en los distintos puntos evaluados de la curva de crecimiento. El quorum-sensing (QS) podría estar relacionado con los cambios temporales de expresión génica, controlando el momento y los niveles de expresión del regulón HrpG. La bacteria monitorea la densidad celular y los diferentes estímulos provocados por el huésped, y sincroniza la expresión de los diferentes factores de virulencia, como el SST3 y proteínas efectoras. El segundo mensajero c-di-GMP podría ser la molécula que media la interacción entre el QS y la cascada regulatoria de HrpG. Esta compleja

red le permitiría a las bacterias adaptarse a los diferentes estados de crecimiento o infección a través de múltiples cascadas de señalización, en el que participa el QS (Andrade, et al., 2006; Barnard y Salmond, 2007; Guo, et al., 2012). Los compuestos a base de cobre, como el Nordox 3X, podrían interferir en el diálogo entre el QS y HrpG, provocando una interrupción en la cascada de señalización necesaria para la patogénesis de la bacteria.

La expresión del gen *hrcR* no muestra diferencias significativas en ambos tratamientos, por lo que se consideraría que su expresión no se ve afectada en presencia de Cu^{++} (figura 33). Este gen pertenece al operón *hrpD* del cluster *hrp*. Si bien las proteínas HrpG/HrpX regulan el cluster *hrp*, probablemente la regulación sea mucho más fina y participen diferentes actores, pudiendo tener cada operón una regulación “independiente”, lo que explicaría el comportamiento del gen *hrcR* a pesar de que el gen *hrpG* esté inhibido por Cu^{++} .

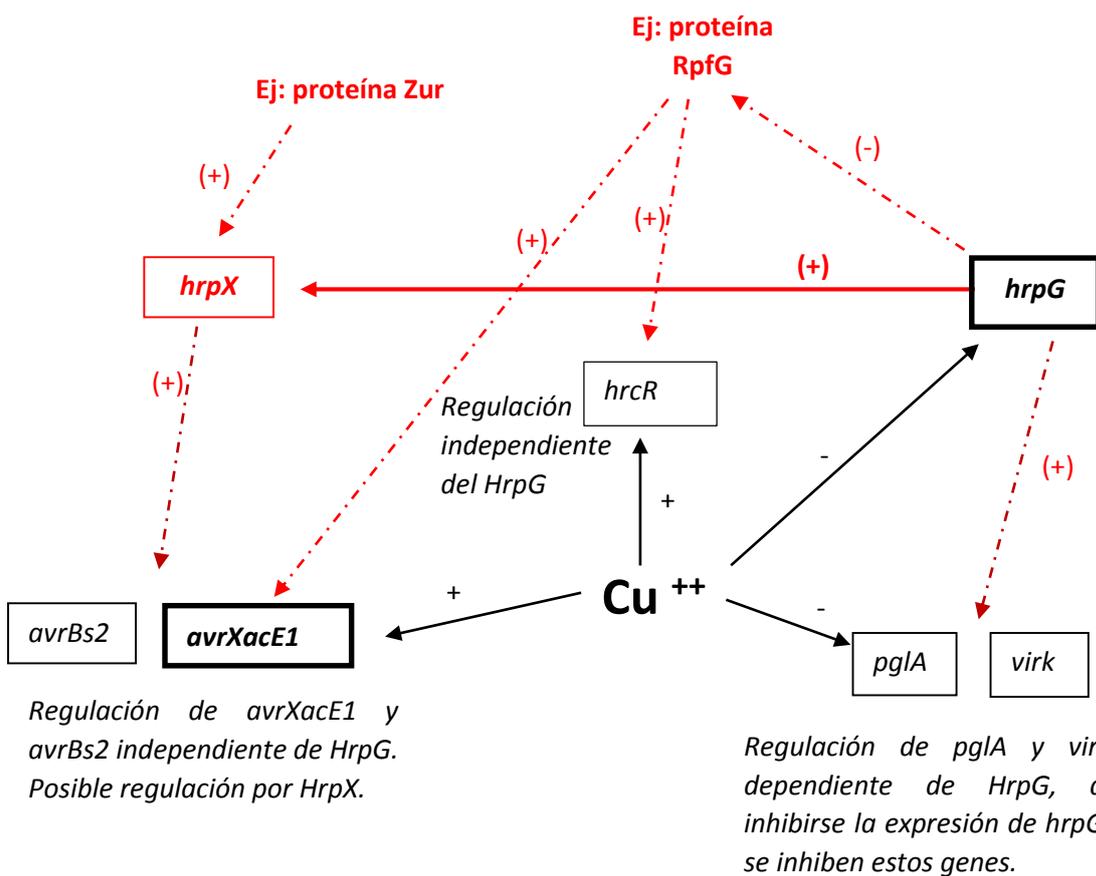


Figura 35. Efecto del Cu^{++} sobre la expresión de los genes *pgIA*, *virK*, *avrXacE1*, *hrcR* y *hrpG*. Los genes, flechas y símbolos en negro son los resultados obtenidos en la tesis, o las tendencias observadas. Los genes que están en un trazo grueso (en negro) es un resultado estadísticamente significativo. Los genes, flechas y símbolos en rojo son los obtenidos de referencias bibliográficas citadas en la discusión. Las flechas rojas (— · — · — ·) corresponden a posibles regulaciones sugeridas en la bibliografía citada.

La presencia de más de una vía de regulación, para los mismos efectores de patogenicidad, podría estar aumentando la probabilidad de sobrevivencia de la bacteria en el tejido vegetal frente a condiciones ambientales adversas (figura 35).

Se podría decir que el cobre comercial actuaría como un inhibidor de la expresión del regulador HrpG, y disminuiría la expresión de algunos genes necesarios para la patogenicidad y virulencia de Xcc. Esto provocaría el retraso y/o disminución de síntomas en plantas que fueron tratadas con el agroquímico. De todas maneras, dentro del tejido vegetal existen determinados elementos o componentes que inducen la expresión de los genes de patogenicidad y virulencia, los cuales superarían el efecto del Cu⁺⁺, explicando la inducción de algunas proteínas efectoras evaluadas.

Expresión de genes de patogenicidad en bacterias en contacto con CuSO₄ in vitro

En este último objetivo se analizó la expresión de los genes *hrpG*, *virK*, *avrXacE1*, *avrBs2*, *hrcR* y *pglA* en bacterias a las cuales se les indujo el estado de VBNC, por tratamiento con sulfato de cobre, en condiciones *in vitro* (del Campo et al., 2009). Como ya se discutió anteriormente, existen antecedentes de que bacterias en estado VBNC siguen expresando ciertos genes, entre los que se encuentran genes asociados con el SST3 y otros genes de virulencia, y además, pueden recuperar su virulencia cuando se encuentran en condiciones ambientales óptimas (Oliver, 2010, Ordax et al, 2006, del Campo et al., 2009).

Los resultados obtenidos muestran que los genes *avrXacE1*, *avrBs2* y *pglA* tienen una disminución significativa de su expresión en el medio con sulfato de cobre, mientras que los genes *virK* y *hrcR* no serían afectados de manera significativa por el metal. Para el caso del gen *hrpG* la gran variabilidad obtenida entre réplicas invalida su análisis (figura 34).

Si comparamos los resultados de expresión obtenidos en el ensayo en plantas tratadas con Nordox 3X y el ensayo *in vitro* con sulfato de cobre, se observan resultados opuestos para algunos genes. Por ejemplo, el gen *avrXacE1* muestra un aumento de expresión en planta, mientras que en el medio con sulfato de cobre se ve disminuida su expresión. El aumento de expresión de algunos genes de patogenicidad en planta, como es el caso del gen *avrXacE1*, podría ser explicado por la regulación independiente del HrpG (como se discutió anteriormente), y/o por la presencia de los factores de la planta que inducen su expresión más allá que haya cobre

libre en la hoja. Al no existir estos factores de la planta en el ensayo *in vitro*, dichos genes no serían expresados, ya sea por inhibición o por falta de inducción directa, o por inhibición de algún regulador que está por encima de la cascada de señalización responsable de la expresión de dichos genes (figura 35).

Sin embargo, se deben tener en cuenta dos aspectos a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Por un lado la solución de cobre, sin fuentes carbonadas o energéticas, en la cual se encuentran las bacterias en el ensayo de inducción de VBNC, podría no estar permitiendo la expresión de estos genes, los cuales normalmente requieren de medios especiales, que simulan el ambiente vegetal, para su expresión (Astua-Monge et al., 2005; Soares et al., 2010, Jalan et al., 2013). Por otro lado, en el ensayo *in vitro* estamos evaluando la expresión génica en bacterias que se encuentran mayoritariamente en estado VBNC (del Campo et al., 2009), mientras que en el ensayo *in planta* la proporción de bacterias VBNC están entre el 20-25%. En ambos sistemas de estudio se están analizando poblaciones que se encuentran en condiciones fisiológicas diferentes.

Sería interesante analizar en el futuro otros genes que participan, directa o indirectamente, en el estado VBNC. Por ejemplo, los exopolisacáridos (EPSs) bacterianos han sido relacionados con la protección contra metales. El mecanismo más común por el cual los EPS protegen a la bacteria es la unión de cationes a los grupos cargados negativamente. En *E. amylovora* se observó que los EPS contribuyen a un mayor tiempo de sobrevivencia de la bacteria frente a cobre, y que en mutantes EPS decrece la culturabilidad y se induce el estado VBNC más rápidamente que en las bacterias *wild type* (Ordax et al., 2010). Además, el ARNm del gen *gumD* (síntesis de EPS) es suficientemente inestable en células de Xcc que están bajo condiciones de estrés, siendo un buen indicador de viabilidad (Scuderi et al., 2010, Golmohammadi et al., 2012). Otro gen que se expresa diferencialmente en bacterias en estado VBNC es *katE*, que codifica para una catalasa involucrada en la protección de la célula contra el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrogeno, H₂O₂, tiene un rol en la inducción del estado VBNC, como ha sido demostrado en *V. vulnificus* (Oliver, 2010). También se observó que el tratamiento de *V. vulnificus* con bajas temperaturas, inductor del estado VBNC, inhibe la actividad catalasa volviendo a la célula altamente sensible (y no cultivable) al peróxido presente en el medio. Cuando la bacteria resucita vuelve a expresar la enzima (Abe et al., 2007). Además, de genes implicados en la patogenicidad, y sobrevivencia de la bacteria, también hay otros genes involucrados en la adhesión, persistencia bacteriana, y un grupo de proteínas extracelulares que participan en la resucitación de las bacterias, denominadas Rpfs (*resuscitation-promoting factors*) que estarían expresándose en bacterias que están en estado VBNC (Oliver, 2010). El análisis de expresión de

estos genes permitiría profundizar en los mecanismos implicados en el estado VBNC e identificar indicadores específicos asociados al mismo.

Con respecto a nuestro sistema en estudio, se puede concluir que el análisis del efecto de Cu^{++} sobre una población bacteriana dentro de la planta es muy complejo. La acción del cobre sobre la bacteria depende de muchos factores, entre los que se encuentran los niveles de inóculo, el tiempo y métodos de aplicación del producto, especie de planta o cultivar, condiciones de agua y estado fisiológico del hospedero. Todo esto puede decrecer la disponibilidad de los iones metálicos (solubles) en las plantas tratadas.

Otra limitante en el estudio del sistema planta-patógeno es el bajo número de plantas que están en las condiciones de crecimiento adecuado para los ensayos de inoculación de bacterias. Además, cabe destacar la dificultad inherente al análisis de expresión de bacterias que se encuentran dentro del tejido vegetal debido a la gran cantidad de ARN vegetal que interfiere con la cuantificación de los ARN bacterianos.

La metodología utilizada en la tesis permitió eliminar el ARN de planta y trabajar solo con el ARN de bacteria. Si bien la cantidad de bacteria obtenida no fue muy abundante (debido a los cortos tiempos de exudación y centrifugación para evitar cambios de expresión) nos permitió obtener resultados significativos a partir del día 5 post-inoculación.

Por último, cabe resaltar que a pesar de su mayor complejidad, los ensayos *in planta* contribuyen a la comprensión de la verdadera significancia biológica de los complejos procesos que se establecen durante una interacción planta-patógeno.

7- CONCLUSIONES

El presente trabajo constituye uno de los primeros estudios sobre el efecto de los agroquímicos a base de cobre sobre el control del cancro cítrico *in planta*, utilizando como modelo el compuesto Nordox 3X. De los resultados obtenidos se desprenden algunas conclusiones del mecanismo de acción sobre la multiplicación y expresión de genes de patogenicidad en Xcc.

- El compuesto de óxido cuproso, Nordox 3X, favorece la muerte de las bacterias dentro de los tejidos.
- Se constató la presencia de células de Xcc en estado VBNC tanto en plantas tratadas con Nordox 3X, como plantas sin tratar. Esto sugiere que el Cu^{++} no participa en la inducción del estado VBNC dentro de la planta.
- De los análisis de expresión *in planta* se concluye que el compuesto Nordox 3X afecta la expresión de algunos genes de patogenicidad, entre los que está el gen *hrpG*. La proteína HrpG es uno de los reguladores principales de la cascada de señalización responsable de la inducción de la enfermedad en la interacción de Xcc con la planta de cítricos, como también en otros patosistemas.

8 – PERSPECTIVAS

La metodología utilizada permitió detectar bacterias en estado VBNC dentro del tejido vegetal. De todas maneras sería interesante poder evaluar dicho estado tomando como marcador de viabilidad otras características del metabolismo, como puede ser la respiración o el análisis de mensajeros, con el fin de confirmar los resultados obtenidos.

Con respecto a los análisis de expresión, existe un gran número de genes que participan en la sobrevivencia y virulencia de Xcc, como por ejemplo, los genes relacionados con la formación de biofilm y producción de exopolisacáridos (EPS). El estudio de los cambios de expresión de dichos genes ampliaría el conocimiento sobre los mecanismos bacterianos que se ven afectados por este tipo de agroquímicos dentro de la planta.

Por último, en el presente trabajo se estudia el efecto de Nordox 3X sobre la bacteria. Sin embargo, observaciones de campo y resultados de laboratorio (no publicados) han sugerido que el cobre puede tener un efecto sobre la inducción de la expresión de ciertos genes relacionados con la defensa de la planta. El análisis del transcriptoma de plantas tratadas con estos compuestos ampliaría la información sobre diferentes genes y vías de regulación que se activan o inhiben en la interacción planta-patógeno.

9 – BIBLIOGRAFÍA

- Abe, A., Ohashi, E., Ren, H., Hayashi, T. and Endo, H. 2007. Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*. *Microbiological Research* 162: 130-138.
- Adachi, S., Fukushima T., and Hiraga, S. 2008. Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes to Cells* 13: 181-197.
- Agustí, M. 2000. *Citricultura*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.Barcelona.México.
- Alexander, E., Pham, D., Steck, TR. 1999. The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3754-3756.
- Alva, AK., Graham, JH. Y Anderson, C. 1995. Soil pH and copper effects on young Hamlin orange trees. *Soil Science Society of American Journal* 59:481-487.
- Andrade, MO., Alegría, MC., Guzzo, CR., Docena, C., Pareda Rosa, MC., Ramos, CHI. and Farah, CS. 2006. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Microbiology* 62: 537-551.
- Arocena, G. et al., 1979. Aspectos de la campaña de prevención y erradicación del cancro cítrico en el Uruguay. Ministerio de Agricultura y Pesca. Dirección de Sanidad Vegetal. Informe técnico nº 8. 25. p.
- Astua-Monge, G., Freitas-Astua, J., Bacocina, G., Roncoletta, J., Carvalho, SA. and Machado., MA. 2005. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Bacteriology* 187:1201-1205.
- Ausubel, F.M. et al. (eds) 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience.
- Baptista, JC., Machado, MA., Homem, RA., Torres, PS., Vojnov, AA. and Morais do Amara, A. 2010. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. *Genetics and Molecular Biology* 33: 146-153.
- Barcina, I. and Arana, I. 2009. The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 8:245-255.
- Barnard, AML. and Salmong, GPC. 2007. Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:415-423.
- Behlau, F., Canteros, BI., Minsavage, GV., Jones, JB. and Graham, JH. 2011. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4089-4096.
- Bogino, PC., Oliva MM., Sorroche, FG. and Giordano, W. 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 15838-15859.
- Bonas, U., Ballvora, A., Büttner, D., Hahn, K., Lahaye, T., Marois, E., Nennstie, D., Noel., L., Pierre., M., Szured, B., Van den Ackerveken, G. and Rossier, O. 1999. Hrp type III secretion-mediated signaling between *Xanthomonas* and the plant. In: *Biology of plant microbe interactions vol. 2*. Eds. de Wit, PJGM., Bisseling, T., Stiekema, W. pp. 23-28.
- Brunings, A. M. y Gabriel, D. W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4:141-157.
- Button, D. K., and B. R. Robertson. 2001. Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1636-1645.
- Canale, F., Francis, M. 1988. Application of ELISA for the campaign to prevent and eradicate citrus canker in Uruguay. *Proceedings of International symposium of citrus canker, declínio/blight and similar diseases* pp. 160-174. Campinas, Brasil. Fundação Cargill.
- Canteros, BI. 1999. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, p.455-459. In A. Mahadevan (ed.), *Plant pathogenic bacteria*. *Proceedings of the International Society of Bacteriology*. Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras, Chennai, India.
- Canteros, B. I. 2004. Management of citrus canker in Argentina. A review. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 10th International Citrus Congreso. Agadir, Morocco, 15-20 febrero. Paper nº90.

- Cappelletti, PA. 2010. Identificacao e análise funcional de interacoes proteína-proteína do sistema de secrecao do tipo III de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de Sao Paulo, Brasil.
- Caputi, P. y Montes, F. 2010. Plan estratégico y diseño institucional para el sector cítrico en Uruguay. Proyecto TCP/URU/3301- FAO.
- Conover, RA. and Gerhold, NR. 1981. Mixtures of copper and maneb or mancozeb for control of bacterial spot of tomato and their compatibility for control of fungus diseases. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 94: 154-156.
- Cubero, J. and Graham, J. H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1257-1264.
- Cubero, J. and Graham, J.H. 2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology* 95:1333-1340.
- Cubero, J. and Graham, JH. 2004. The leucine-responsive regulatory protein (Irp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 429-437.
- da Silva, ACR., Ferro, JA., Reinach, FC., Farah, CS., Furlan, LR., Quaggio, RB., Monteiro-Vitorello, CB., Van Sluys, MA., Almeida, NF., Alves, LMC., do Amaral, AM., Bertolini, MC., Camargo, LEA., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, LP., Cicarelli, RMB., Coutinho, LL., Cursino-Santos, JR., El-Dorry, H., Faria, JB., Ferreira, AJS., Ferreira, RCC., Ferro, MIT., Formighieri, EF., Franco, MC., Greggio, CC., Gruber, A., atsuyama, AM., Kishi, LT., Leite, RP., Lemos, EGM., Lemos, MVF., Locali, EC., Machado, EC., Madeira, AMBN., Martinez-Rossi, NM., Martins, EC., Meidanis, J., Menck, CFM., Miyaki, CY., Moon, DH., Moreira, LM., Novo, MTM., Okura, VK., Oliveira, MC., Oliveira, VR., Pereira, HA., Rossi, A., Sena, JAD., Silva, C., de Souza, RF., Spinola, LAF., Takita, MA., Tamura, RE., Texeira, EC., Tezza, RIC., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, SM., White, FF., Setúbal, J.C. and Kitajima, JP. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.
- Das, A. K. 2003. Citrus canker- a review. *Journal of Applied Horticulture* 5:52-60.
- de Souza Carvalho, F. M., Pereira, L. and Pereira, R. 2005. Genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* based on plasmid profile and pulsed field gel electrophoresis. *Genetics and Molecular Biology* 28:446-451.
- del Campo, R., Russi, P., Mara, P., Mara, H., Peyrou, M., Ponce de León, I. and Gaggero, C. 2009. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiology Letters* 298: 143-148.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Domingues, M.N., de Souza T.A., Cernadas, R.A., Peixoto de Olivera, M.L., Docena, C., Shaker Farah, C. and Benedetti, C.E. (2010). The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Molecular Plant Pathology* 11: 663-675.
- Duan, Y. P., Castañeda, A., Zhao, G., Erdos, G. and Gabriel, D. W. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:556-560.
- Dunger, G., Arabolaza, AL., Gottig, N., Orellano, EG. and Ottado, J. 2005. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathology* 54: 781-788.
- Dunger, G., Relling, V.M., Tondo, M.L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E.G. and Ottado, J. 2007. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives of Microbiology* 188: 127-135.
- Epstein, SS. 2009. Microbial awakenings. A theory of how microbes “wake up” from dormancy could help to solve scientific mysteries and improve disease control. *Nature* 457: 1083.
- Fronzes, R., Christie, PJ. and Waksman, G. 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Review Microbiology* 7: 703-714.

- Ghezzi, JI. and Steck, TR. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 203-208.
- Golmohammadi, M., Cubero, J., Lopez, MM. and Llop, P. 2013. The Viable but-nonculturable state in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a reversible state induced by low nutrient availability and copper stress conditions. *Journal of Life Sciences* 7: 1019-1029.
- Golmohammadi, M., Llop, P., Scuderi, G., Gell, I., Graham, JH. and Cubero, J. 2012. mRNA from selected genes is useful for specific detection and quantification of viable *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Pathology*, 61: 479-488.
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press, San Diego.
- Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G. and Ottado, J. 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS ONE* 4: e4358.
- Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J. and Achor, D. S. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* 5: 1-15.
- Graham, JH., Gottwald, TR., Riley, TD. and Bruce, MA. 1992. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology* 82:452-457.
- Grey, B. and Steck, TR. 2001. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5325-5327.
- Guo, Y., Figueiredo, F., Jones, J. and Wang, N. 2011. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 24: 649-661.
- Guo, Y., Zhang, Y., Li, J-L. and Wang, N. 2012. Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interact* 25: 165-179
- Hou, S., Yang, Y. and Zhou, J-M. 2009. The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen. *Plant Signaling & Behavior* 4: 283-293.
- Huang, DL., Tang, D-J., Liao, Q., Li, X-Q., He, Y-Q., Feng, J-X., Jiang, B-L., Lu, G-T. and Tang, J-L. 2009. The Zur of *Xanthomonas campestris* is involved in hypersensitive response and positively regulates the expression of the hrp cluster via hrpX but not hrpG. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22: 321-329.
- Huang, T-P., Lu, K-M. and Chen, Y-H. 2013. A novel two-component response regulator links rpf with biofilm formation and virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *PLoS ONE* 8: e62824
- Jacob, TR., Laia, ML., Ferro, JA. and Ferro, MIT. 2011. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. *Biotechnology Letters* 33: 1177-1184.
- Jalan, N., Kumar, D., Andrade, MO, Yu, F., Jones, JB., Graham, JH., White, FF., Setubal, JC. and Wang, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. *Genomics* 14:551.
- Jardine, DJ. and Stephens, CT. 1987. Influence of timing of application and chemical on control of bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 71: 405
- Jones, J.D G and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kay, S. and Bonas, U. 2009. How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology* 12: 1-7.
- Kunkel, BN. and Chen, Z. 2006. Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. *Prokaryotes* 2: 421-440
- Kussell E, Leibler S. 2005. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309:2075-2078
- Laia, M.L., Moreira, L.M., Dezajacomo, J., Brigati, JB., Ferreira, C.B., Ferro, MIT., Silva, ACR, Ferro, JA. and Oliveira, JCF. 2009. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiology* 9:12.
- Leite, RP., Mohan, SK., Pereira, AL. and Campacci, CA. 1987. Controle integrado de cancro cítrico efeito da resistencia genética e da aplicacao de bactericidas. *Fitopatol Brás* 12:257-263.
- Lew, S., Lew, M., Mieszczyński, T. and Szarek, J. 2010. Selected Fluorescent Techniques for Identification of the physiological state of individual water and soil bacterial cells – review. *Folia Microbiologica* 55: 107-118.

- Li, J. and Wang, N. 2011. The WxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Molecular plant pathology* 12: 381-396.
- Li, J. and Wang, N. 2011b. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS ONE* 6: e21804.
- Livak, KJ. and Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 25: 402-408.
- López, M. M. 2000. Cancrosis de los cítricos (Citrus canker). En: *Enfermedades de cítricos*. Ed. Mundi-Prensa.
- Mara, H. and Ibáñez, W. 2004. Citrus Canker Control: sprayer effect, products and time of application. 10th International Citrus Congress. Agadir, Marruecos 2004. Abst. P72.
- Marco, G. M., and Stall, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67:779-781.
- Mehta, A. and Rosato, YB. 2005. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA. *Genetics and Molecular Biology* 28: 140-149.
- MGAP-DIEA. Encuesta Citrícola "Primavera 2012"
- MGAP-DIEA. Encuesta Citrícola "Primavera 2013"
- Moreira, LM., de Souza, RF., Almeida, NFJr., Setubal, JC., Oliveira, JCF., Furlan, LR., Ferro, JA. and da Silva, CR. 2004. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 42: 163-184.
- Moreira, L.M., Almeida, Jr, N.R., Potnis, N., Digiampietri, L.A., Adi, S.S., Bortolossi, J.C., da Silva, A.C., da Silva, A.M., de Moraes, F.E., de Oliveira, J.C., de Souza, R.F., Facincani, A.P., Ferraz, A.L., Ferro, M.I., Furlan, L.R., Gimenez, D.F., Jones, F.B., Kitajima, E.W., Laia, M.L, Leite, Jr, R.P., Nishiyama, M.Y., Rodrigues Neto, J., Nociti, L.A., Norman, D.J., Ostroski, E.H., Pereira, Jr, H.A., Staskawicz, B.J., Tezza, R.I., Ferro, J.A., Vinatzer, B.A. and Setubal, J.C. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker base on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli*. *BMC Genomics* 11:238.
- Nyström, T. 2005 Bacterial senescence, programmed death, and premeditated sterility. *ASM News* 71: 363-369.
- Oliver, JD. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 415-425.
- Ordax, M., Biosca, EG., Wimalajeewa, SC., Lopez, MM. and Marco-Noales, E. 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature Apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology* 107: 106-116.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. and Biosca, EG. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: Induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3482-3488.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., Lopez, MM. and Biosca, EG. 2010. Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Research in Microbiology* 161: 549e555.
- Reichert-Schwillinsky, F., Pin, C., Dzieciol, M., Wagner, M. and Hein, I. 2009. Stress –and growth rate-related differences between plate count and real-time PCR data during growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2132-2138.
- Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P.S., Qüesta, J., Dow, JM, Castagnaro, AP., Vojnov, AA. and Marano, MR. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 20:1222-1230.
- Rinaldi, D. A. M. F., and Leite, R. P., Jr. 2000. Adaptation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. *Proceedings of International Society of Citriculture* 2:1064
- Römling, U., Gomelsky, M. and Galperin, MY. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology* 57: 629-639.
- Sachidanandham, R. and Yew-Hoong Gin, K. 2009. A dormancy state in nonspore-forming bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 927-941.
- Saier MH, Jr. 2006. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *The Journal of Membrane Biology* 214(2):75-90.

- Schaad, NW., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, PE., Stromber, VK. and Vidaver, AK. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 690-695.
- Schubert, T. S. and Sun, X. 2003. Bacterial citrus canker. *Plant Pathology circular* nº 377. Fl.Dept.Agric & Couns. Svcs. Division of Plant Industry.
- Schubert, T. S., Rizvi, S. A., Sun, X., Gottwald, T. R., Graham, J. H. and Dixon, W. N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. *Plant Disease* 85:340-356.
- Schuttle, G.C., Beeton, K.V. and Kotzé, J.M. 1997. Rind stippling on Valencia Oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 81:851-854.
- Scuderi, G., Golmohammadi, M., Cubero, J., López, MM., Cirvilleri, G. and Llop, P. 2010. Development of a simplified NASBA protocol for detecting viable cells of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under different treatments. *Plant Pathology* 59: 764-772.
- Siciliano, F., Torres, P., Sendín, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellece, G., Ramallo, J., Castagnaro, A., Vojnov, A. and Marano, MR. 2006. Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in Citrus limon. *Electronic Journal of Biotechnology* DOI: 10.2225/vol9-issue3-20.
- Smith, CJ., Nedwell, DB., Dong, LF. and Osborn, AM. 2006. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology* 8: 804-815.
- Soares, MR., Facincani, AP., Ferreira, RM., Moreira, LM., de Oliveira, JCF., Ferro, JA., Ferro, MIT, Meneghini, R. and Gozzo, FC. 2010. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. *Proteome Science* 8:55
- Stall, R. E., Marcó, G. M. and Canteros, B. I. 1982. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of citrus. *Phytopathology* 72:1097-1100.
- Stall, RE., Canteros de Echenique, BI. and Marco, GM. 2002. Inóculo, diseminación y sobrevivencia de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson en Corrientes, Argentina. *Curso de actualización para profesionales, canker de los citrus, fundamentos del manejo integrado. Aspectos teóricos y prácticos*, pp. 150-164.
- Stall, RE., Miller, JW., Marco, GM. and Canteros de Echenique, BI. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 93:10-14.
- Stall, RE., Miller, JW., Marco, GM., Canteros de Echenique, BI. 1982. Timing of sprays to control canker of grapefruit in Argentina. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1:414-417.
- Stuurman, N., Pacios Bras, C., Schlaman, HR., Wijfjes, AH., Bloemberg, G. and Spanik, HP. 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1163-1169.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X-h., Wang, R., Guo, Q. and Dong, Yi. 2008. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 37-44.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T. and Gabriel, D. W. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhost. *Molecular plant-microbe interactions* 5:204-213.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Gogez, V., Bonas, U. and Buttner, D. 2010. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytologist* 187: 983-1002.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. and Nguyen, M. 2010. A practical approach to RT-qPCR-publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50: S1-S5.
- Teixeira, EC., de Oliveira, JCF., Marquez Novo, MT. and Bertolini, MC. 2008. The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiology* 154: 402-412.
- Thattai M. and van-Oudenaarden, A. 2004. Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* 167:523-530
- Verinere, C., Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Civerolo, E. L., Alvarez, A. M., Maestri, P. and Luisetti, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology* 104:477-487.
- Vojnov, A.A., Morais do Amaral, A., Dow, JM., Castagnaro, P. and Marano, MR. 2010. Bacteria causing important diseases of citrus utilize distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 467 - 477.

- Vora, GJ., Meador, CE., Birds, MM., Bopp, CA., Andreadis, JD. and Stenger, DA. 2005. Microarray-based detection of genetic heterogeneity antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *PNAS* 102: 19109-19114.
- Yamazaki, A., Hirata, H. and Tsuyumu, S. 2008 b. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of General Plant Pathology* 74:138-150.
- Yamazaki, A., Hirata, H. and Tsuyumu, S. 2008. Type III regulators HrpG and HrpXct control síntesis fo a-amylase, which is involved *in planta* multiplication of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of General Plant Pathology* 74: 254-257.
- Yan, Q. and Wang, N. 2011. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen. *Journal of Bacteriology* 193: 1590-1599
- Yan, Q. and Wang, N. 2012. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 25: 69-84.
- Yaron, S. and Matthews, KR. 2002. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology* 92: 633-640.
- Zhong-kang, W., Xian-yun, S., You-ping, Y., Chang-yong, Z. and Yu-xian, X. 2004. Comparison of PCR, DIA and pathogenicity assay for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Agricultural Sciences in China* 3:001-006.

10 - APENDICES

APENDICE 1

Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)

Clonación, transformación y confirmación

Los clones seleccionados, que poseen el plásmido de interés, dieron bandas del tamaño esperado cuando se amplificaron con los cebadores específicos. Los mismos fueron confirmados por secuenciación (realizadas por el servicio de secuenciación de Macrogen).

Extracción de ADN plasmídico y cuantificación

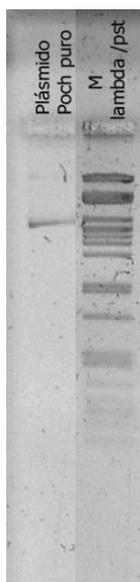
Los plásmidos que llevan el fragmento de los genes relacionados con la patogenicidad fueron cuantificados por espectrofotometría utilizando el *Nanodrop1000 Spectrophotometer* (Thermoscientific). Las cantidades de plásmidos obtenidas luego de la extracción se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración plásmidos utilizados para el cálculo de la eficiencia.

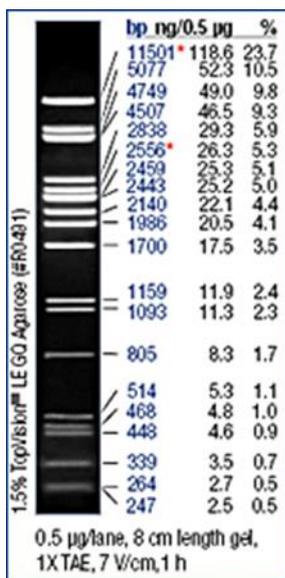
Plásmido-gen	ng/ μ l	260/280	260/230
pGEM- <i>Bs2</i>	487.6	1.97	2.32
pGEM- <i>hrcR</i>	406.2	1.96	2.42
pGEM- <i>virK</i>	430.5	1.96	2.34
pGEM- <i>avrXacE1</i>	348.7	1.96	2.33
pGEM- <i>hrpG</i>	297.6	2.04	2.43
pGEM- <i>pgIA</i>	349.6	2.02	2.42

El plásmido que contiene el fragmento del gen *lrp*, denominado pGEM-*lrp*, fue cuantificado por nanodrop y por gel de agarosa 1%. Se cuantificó de dos formas para tener un dato más exacto, ya que a partir de este plásmido se construyó la curva estándar para la cuantificación absoluta que se realizará en los ensayos de curvas de crecimiento.

El resultado de cuantificación por nanodrop fue 68,9 ng/ μ l y el resultado del gel fue 50 ng/ μ l, aproximadamente. Se promedió ambas cuantificaciones, estimándose una concentración del plásmido pGEM-*lrp* de \approx **60ng/ μ l**. El nanodrop puede estimar un poco más de cantidad de plásmido ya que cuantifica todas las formas presentes, que en el gel no se ven o son mucho más tenues (figura 1).



A



B

Figura 1. A) Cuantificación del plásmido en gel de agarosa 2%. Carril 1: 1 ul del plásmido Irp extraído con el kit GenCatch Plus Plasmid DNA Miniprep (PochLifeScience), carril 2: 2.5 ul marcador de PM lambda/pst (0.5µg/lane). B) Esquema del marcador lambda/pstI.

APENDICE 2.

Análisis de la multiplicación de Xcc en plantas tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.

Cuantificación de Xcc por crecimiento en medio sólido

Tabla 2. Cuantificación de Xcc in planta por crecimiento en medio sólido. Resultados expresados como log ufc/cm² de hoja para plantas de pomelo tratadas con agua o Nordox3X para diferentes tiempos luego de la inoculación con Xcc (3 repeticiones biológicas).

Tratamiento con agua (log ufc/cm ²)					
Días	repeticion 1	repeticion 2	repeticion 3	promedio	desvío
0	0,4	1,2	1,6	1,1	0,32
1	1,3	1,9	2,3	1,8	0,29
3	1,9	2,7	2,0	2,2	0,24
5	3,4	3,6	3,6	3,5	0,08
7	4,4	5,3	4,3	4,7	0,31
9	6,3	6,3	6,3	6,3	0,01
Tratamiento con Nordox3x (log ufc/cm ²)					
Días	repeticion 1	repeticion 2	repeticion 3	promedio	desvío
0	ND	0,5	0,9	0,7	0,20
1	0,6	0,5	0,6	0,6	0,04
3	0,3	1,0	ND	0,7	0,32
5	ND	ND	1,3	1,3	0,00
7	3,2	ND	3,3	3,2	0,05
9	4,9	4,1	5,1	4,7	0,30

ND: para las plantas tratadas con Nordox 3X, en algunos de los tiempos no se obtuvieron las 3 repeticiones debido a que no se sembró la dilución correcta y no se pudo cuantificar la cantidad de bacteria recuperada, o la presencia de colonias contaminantes que impedía el conteo.

Cuantificación de Xcc por qPCR

Tabla 3. Cts de obtenidos de las diluciones del pGEM-Irp para la construcción de la curva estándar.

Color	muestra	tipo	Ct
	plásmido Irp -2	Standard	11,45
	plásmido Irp -3	Standard	14,80
	plásmido Irp -4	Standard	18,53
	plásmido Irp -5	Standard	21,09
	plásmido Irp -6	Standard	25,29
	plásmido Irp -7	Standard	28,60

Color	muestra	tipo	Ct
	blanco	NTC	30,38

Figura 2. Curva estándar y muestras de la repetición biológica 1 y 2 de los análisis de cuantificación por qPCR.

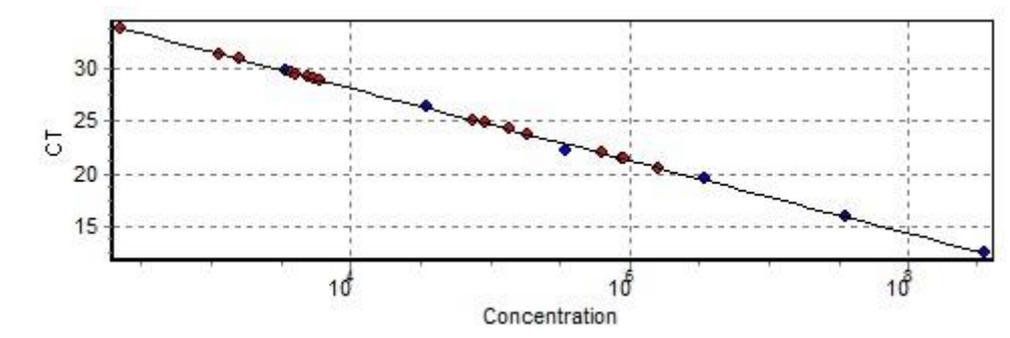


Figura 3. Curvas de amplificación de las muestras de la repetición 1 y 2, junto con la curva estándar.

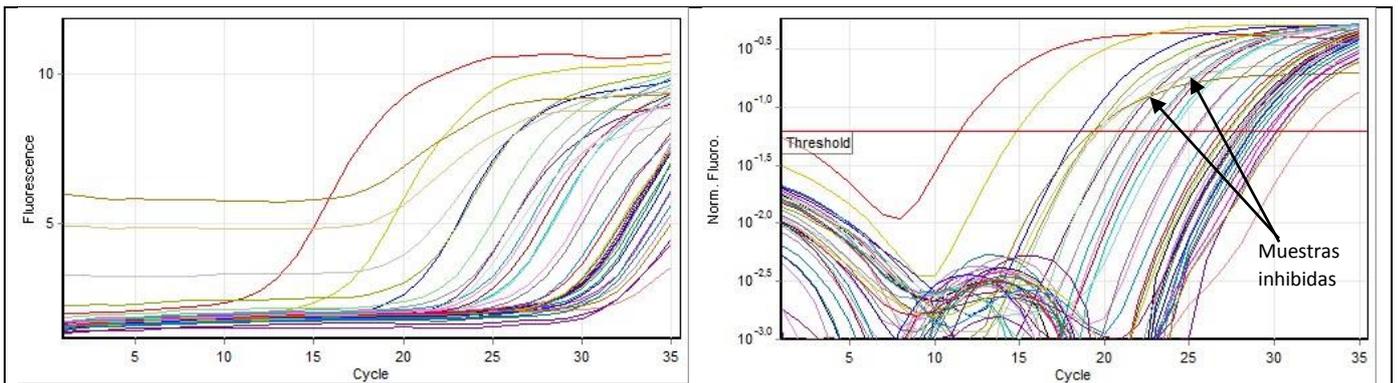


Tabla 4. Datos de los Ct y concentración obtenidos por qPCR para la repetición biológica 1 y 2.

Colour	Name	Type	Ct	GivenConc (copies/ul)	CalcConc (copies/ul)	% Var
	plásmido lrp -2	Standard	11,45	348000000	337080049,477812	3,1%
	plásmido lrp -3	Standard	14,80	34800000	35391219,1029305	1,7%
	plásmido lrp -4	Standard	18,53	3480000	2883310,32635879	17,1%
	plásmido lrp -5	Standard	21,09	348000	515860,927680339	48,2%
	plásmido lrp -6	Standard	25,29	34800	30528,2487158412	12,3%
	plásmido lrp -7	Standard	28,60	3480	3278,84569136221	5,8%
	rep1 agua 0d	Unknown	32,11		308,40171717847	
	rep1 agua 1d	Unknown	28,20		4309,78156667418	
	rep1 agua 3d	Unknown	29,68		1582,70330722924	

Colour	Name	Type	Ct	GivenConc (copies/ul)	CalcConc (copies/μl)	% Var
■	rep1 agua 5d	Unknown	27,62		6365,57103335454	
■	rep1 agua 7d	Unknown	23,61		94067,2122176951	
■	rep1 agua 9d	Unknown	19,64		1364113,81417757	
■	rep1 agua 9d-1	Unknown	20,81		619537,961674008	
■	rep1 agua 9d-2	Unknown	23,97		74237,991594837	
■	rep1 ndx 0d	Unknown	27,93		5170,53671654097	
■	rep1 ndx 1d	Unknown	28,37		3824,67299170269	
■	rep1 ndx 3d	Unknown	30,16		1149,46851931398	
■	rep1 ndx 5d	Unknown	27,78		5685,6714790891	
■	rep1 ndx 7d	Unknown	23,08		134827,761847615	
■	rep1 ndx 9d	Unknown	19,28		1738763,63946878	
■	rep1 ndx 9d-1	Unknown	19,34		1666832,98030476	
■	rep1 ndx 9d-2	Unknown	22,59		187861,385260879	
■	rep2 agua 0d	Unknown	28,87		2737,3037489865	
■	rep2 agua 1d	Unknown	28,02		4864,90552250556	
■	rep2 agua 3d	Unknown	29,48		1810,74297537452	
■	rep2 agua 5d	Unknown	28,03		4820,09885402435	
■	rep2 agua 7d	Unknown	21,85		307737,87519841	
■	rep2 agua 9d	Unknown	19,52		1481023,24650029	
■	rep2 agua 9d-1	Unknown	21,78		322703,754902889	
■	rep2 agua 9d-2	Unknown	25,18		32799,2530513514	
■	rep2 ndx 0d	Unknown	27,13		8832,34208818865	
■	rep2 ndx 1d	Unknown	26,82		10856,6351457753	
■	rep2 ndx 3d	Unknown	27,26		8071,47133028837	
■	rep2 ndx 5d	Unknown	28,65		3171,86839024792	
■	rep2 ndx 7d	Unknown	30,08		1215,93722636589	
■	rep2 ndx 9d	Unknown	22,76		167298,85637882	
■	rep2 ndx 9d-1	Unknown	26,28		15648,1333359933	
■	rep2 ndx 9d-2	Unknown	29,15		2267,71734309511	
■	blanco	NTC	30,38		990,254247601594	

Figura 4. Curva estándar y muestras de la repetición biológica 3 de los análisis de cuantificación por qPCR.

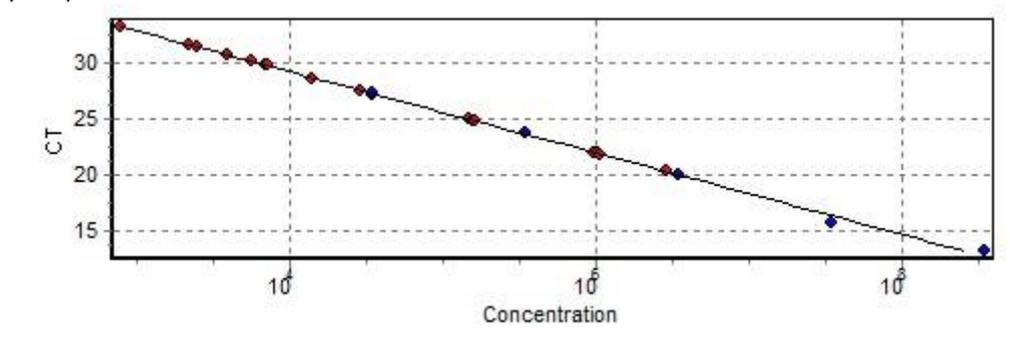


Figura 5. Curvas de amplificación de las muestras de la repetición 3 junto con la curva estándar.

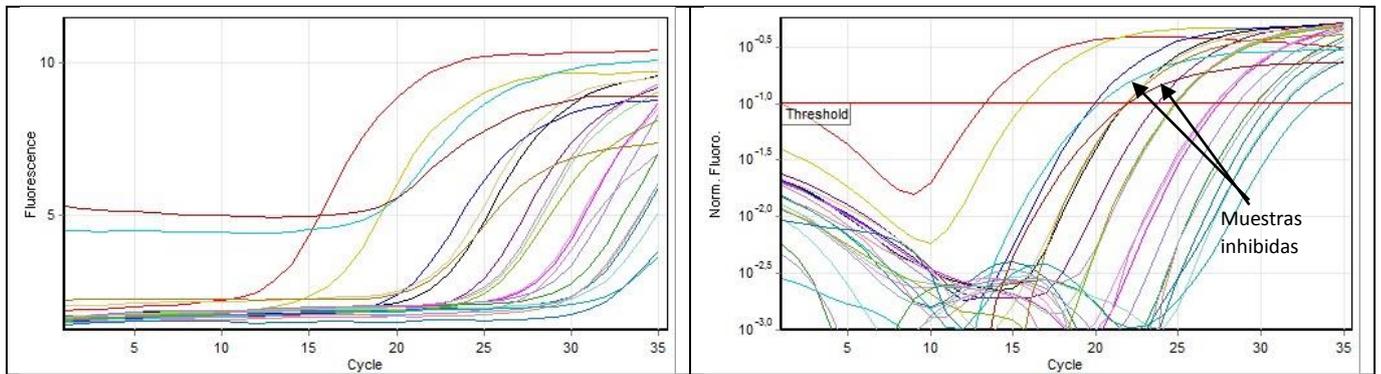


Tabla 5. Datos de los Ct y concentración obtenidos por qPCR para repetición biológica 3.

Colour	Name	Type	Ct	GivenConc (copies/ μ l)	CalcConc (copies/ μ l)	% Var
Red	plásmido lrp -2	Standard	13,31	348000000	256171079,775361	26,4%
Yellow	plásmido lrp -3	Standard	15,75	34800000	53464456,3826185	53,6%
Blue	plásmido lrp -4	Standard	19,99	3480000	3552706,28171466	2,1%
Purple	plásmido lrp -5	Standard	23,78	348000	313586,942134281	9,9%
Pink	plásmido lrp -6	Standard	27,28	34800	33449,0425841756	3,9%
Teal	rep3 agua 0d	Unknown	30,64		3877,12653383495	
Light Red	rep3 agua 1d	Unknown	29,76		6818,30509637847	
Green	rep3 agua 3d	Unknown	29,71		7014,72239695656	
Magenta	rep3 agua 5d	Unknown	27,50		28939,2457187812	
Black	rep3 agua 7d	Unknown	21,88		1055106,61732068	
Cyan	rep3 agua 9d	Unknown	20,31		2886676,1198789	
Gold	rep3 agua 9d -1	Unknown	21,86		1072064,04386394	
Light Green	rep3 agua 9d -2	Unknown	24,95		148394,172212202	

Colour	Name	Type	Ct	GivenConc (copies/μl)	CalcConc (copies/ul)	% Var
	rep3 ndx 0d	Unknown	31,36		2453,54818955752	
	rep3 ndx 1d	Unknown	30,07		5573,29241702515	
	rep3 ndx 3d	Unknown	28,64		13965,5262064918	
	rep3 ndx 5d	Unknown	27,21		34791,9093695797	
	rep3 ndx 7d	Unknown	24,84		159233,926401771	
	rep3 ndx 9d	Unknown	22,04		957575,472489844	
	rep3 ndx 9d -1	Unknown	21,93		1022841,22728666	
	rep3 ndx 9d -2	Unknown	24,88		155341,818099665	
	blanco manipulación	NTC	33,16		772,155296236665	
	blanco reactivos	NTC	31,53		2198,08861713206	

Figura 6. Picos de melting obtenidos para las diferentes muestras de la curva de crecimiento

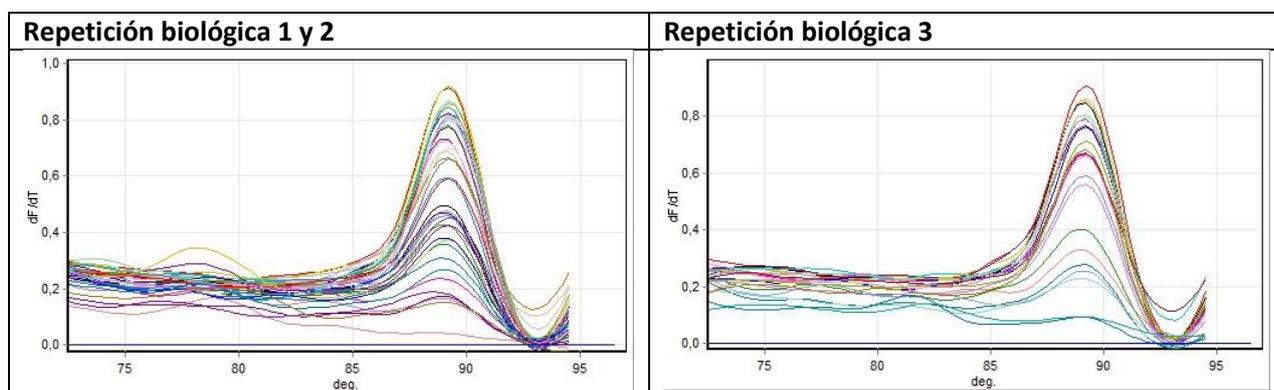


Tabla 6. Cuantificación de Xcc por qPCR. Resultados expresados como log nº de copia del gen *lrp/cm²* de hoja para plantas de pomelo tratadas con agua o Nordox 3X a diferentes tiempos luego de la inoculación con Xcc (3 repeticiones biológicas).

Tratamiento con agua (log nºcopia/cm²)					
Días	repetición 1	repetición 2	repetición 3	promedio	desvío
0	2,0	3,2	3,3	2,8	0,40
1	3,4	3,4	3,6	3,4	0,08
3	3,0	3,0	3,6	3,2	0,19
5	3,5	3,4	4,0	3,6	0,19
7	4,7	5,2	5,6	5,2	0,28
9	6,6	6,2	6,9	6,6	0,18
Tratamiento con Nordox3x (log nºcopia/cm²)					
Días	repetición 1	repetición 2	repetición 3	promedio	desvío
0	3,4	3,6	3,0	3,3	0,17
1	3,4	3,6	3,5	3,5	0,08
3	2,9	3,7	3,8	3,5	0,31
5	3,5	3,3	4,2	3,7	0,27
7	4,8	2,9	4,9	4,2	0,67
9		5,0	6,9	6,3	0,66

APENDICE 3

Análisis la inducción del estado VBNC de Xcc en plantas de cítricos tratadas con Nordox 3X y en plantas tratadas con agua.

Tabla 7. Proporción de bacterias cultivables, VBNC y muertas en la muestra de agua y Nordox 3X a los 5 días.

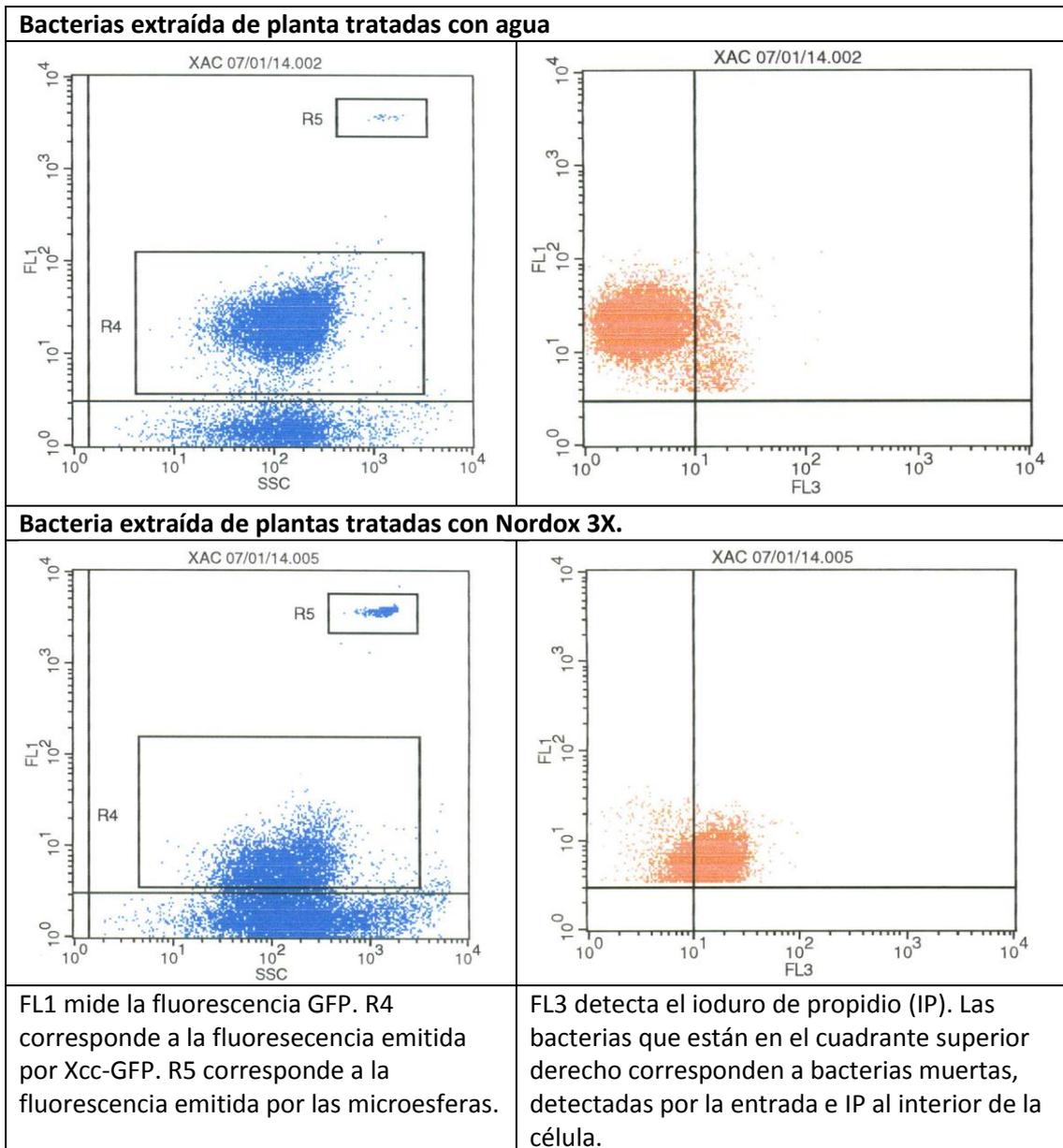
% de bacterias					
5 días agua	rep1	rep2	rep3	promedio	DS/raíz nº rep
cultivables		78	59	68,5	9,5
VBNC	ND*	16	23	19,5	3,5
muertas	5	6	18	9,7	4,9
% de bacterias					
5 días Nordox	rep1	rep2	rep3	promedio	DS/raíz nº rep
cultivables	0	1	0	0,3	0,3
VBNC	21	37	20	26	5,5
muertas	79	62	80	73,7	5,8

*ND: no determinada la proporción de VBNC debido que se cuantificó más bacterias cultivables por crecimiento en placa que totales por citometría. Las bacterias totales corresponden a vivas + muertas. Dentro de las vivas se encuentran las cultivables y las VBNC.

Tabla 8. Proporción de cultivables, VBNC y muertas en muestras de Nordox a los 5 y 7 días.

% de bacterias					
5 días Nordox	rep1	rep2	rep3	promedio	DS/raíz nº rep
cultivables	0	1	0	0,3	0,3
VBNC	21	37	20	26	5,5
muertas	79	62	80	73,7	5,8
% de bacterias					
7 días Nordox	rep1	rep2	rep3	promedio	DS/raíz nº rep
cultivables	0	0	2	0,7	0,7
VBNC	17	0	14	10,3	5,2
muertas	83	73	84	80,0	3,5

Figura 7. Gráficos generados por el citometro de flujo.

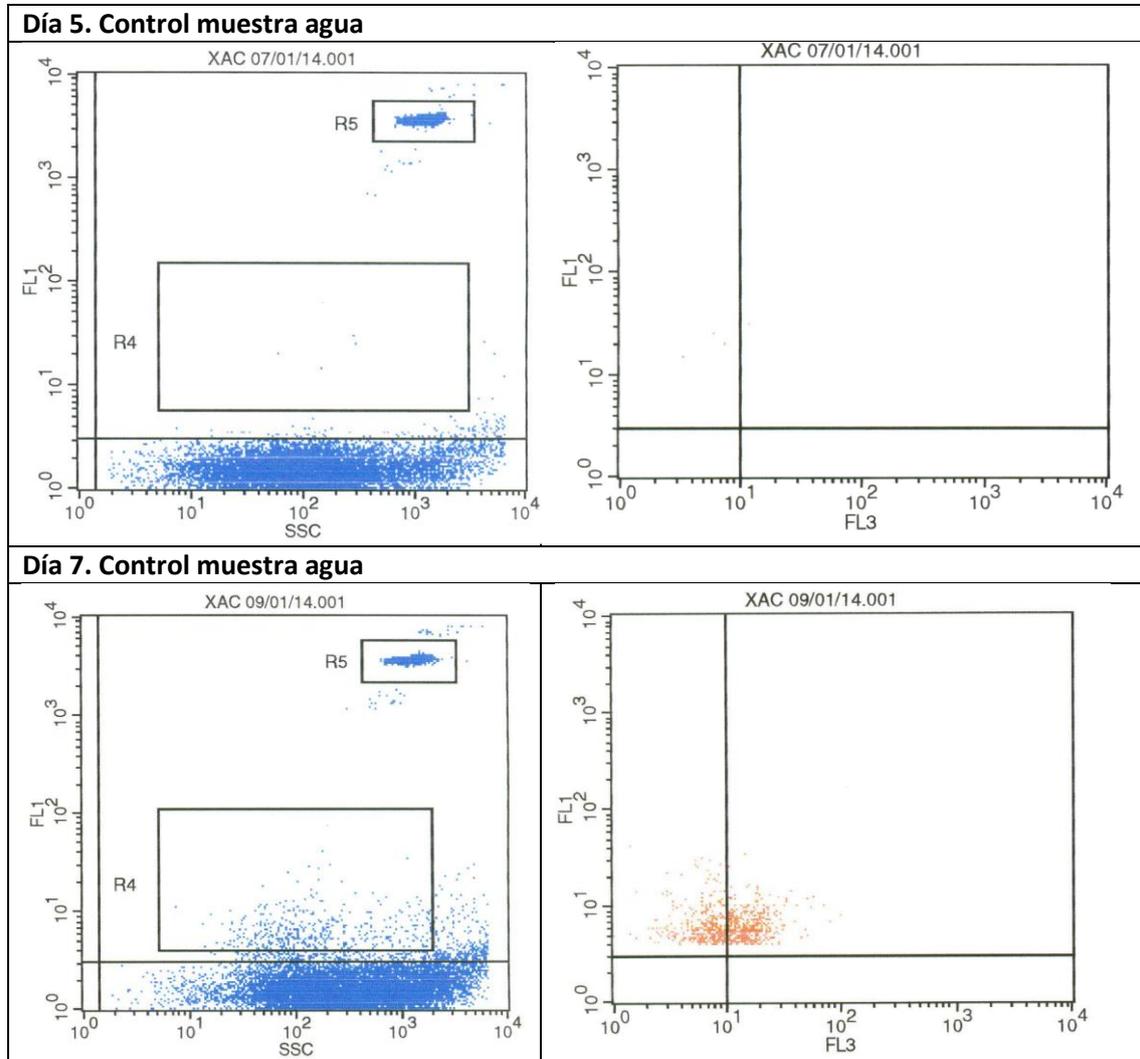


Las tres repeticiones biológicas, tanto para el día 5 y 7, dieron iguales. Claramente se observa una diferencia en la distribución de las bacterias en muestras con agua y muestras con Nordox 3X.

Controles de citometría.

Los controles se realizaron a partir de hojas que no fueron inoculadas con la bacteria. Los mismos fueron procesados iguales que las muestras.

Figura 8. Controles con agua del ensayo de citometría de flujo.

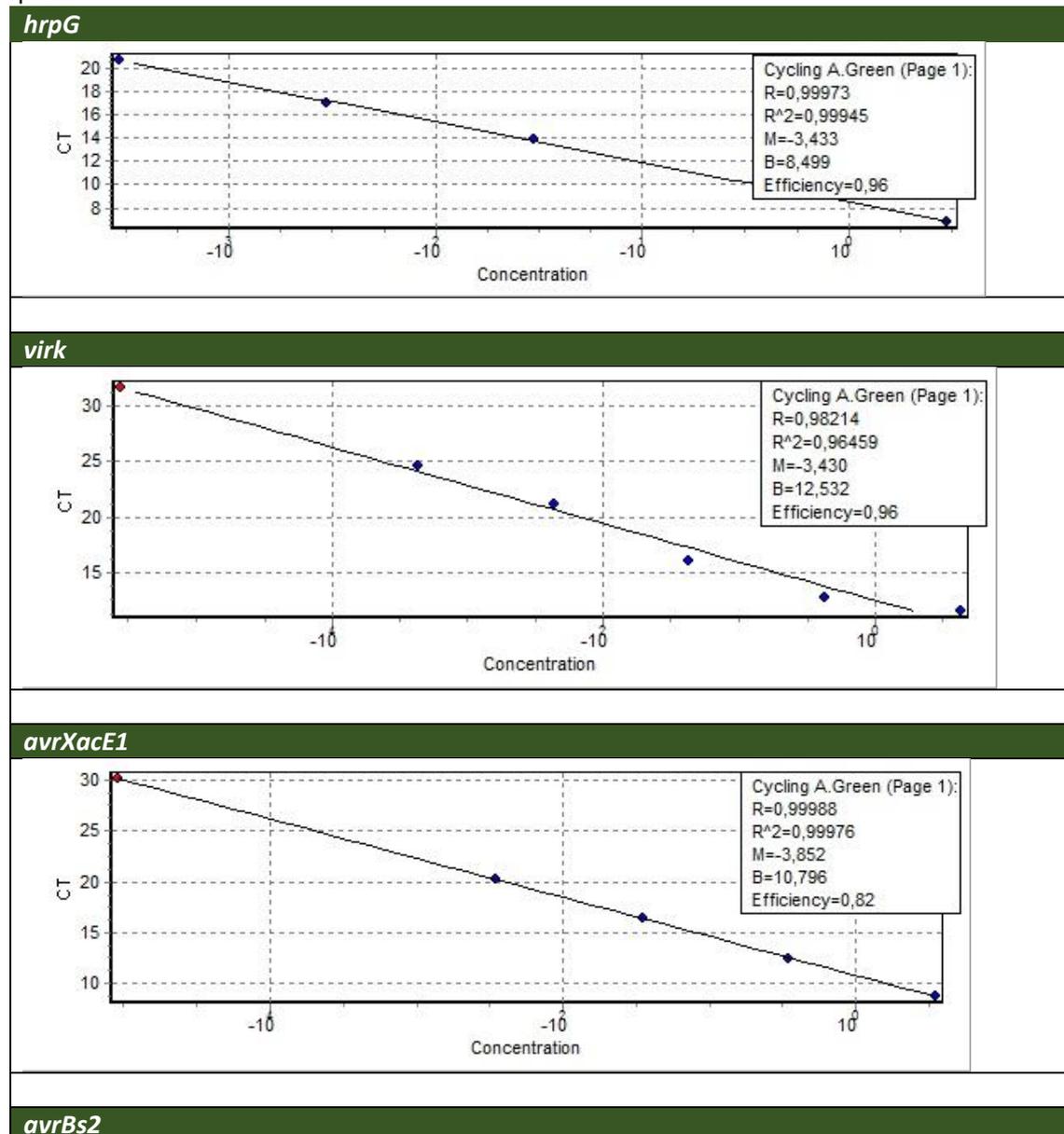


Los controles se realizaron para la muestra con agua. Se puede observar que la fluorescencia detectada no es significativa comparada con las muestras de hojas con Xcc inoculada.

APENDICE 4

Expresión diferencial de genes de Xcc relacionados con la patogenicidad de la bacteria en plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua.

Figura 9. Eficiencias de los cebadores diseñados para los genes de patogenicidad, obtenidas por qPCR.



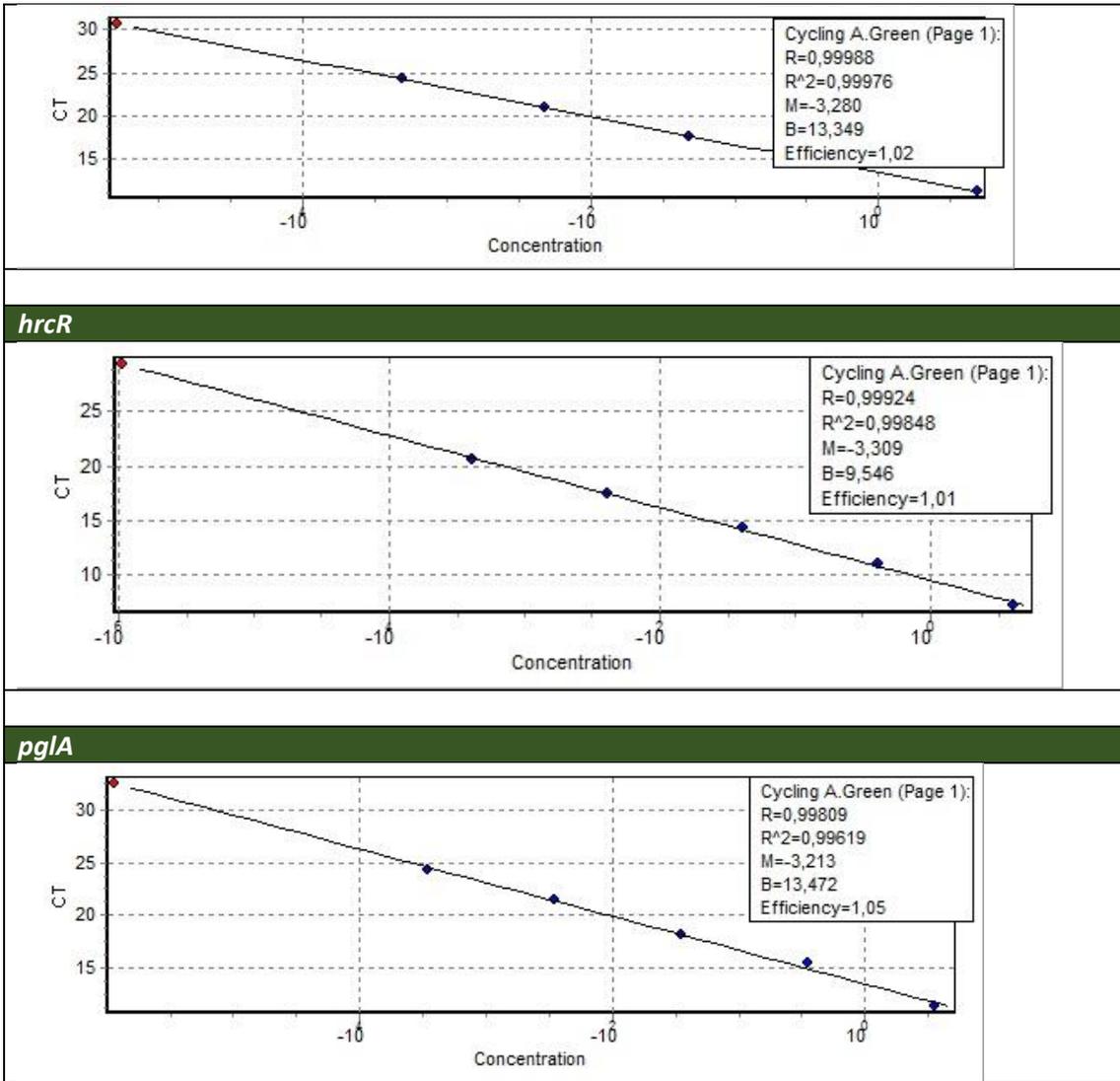
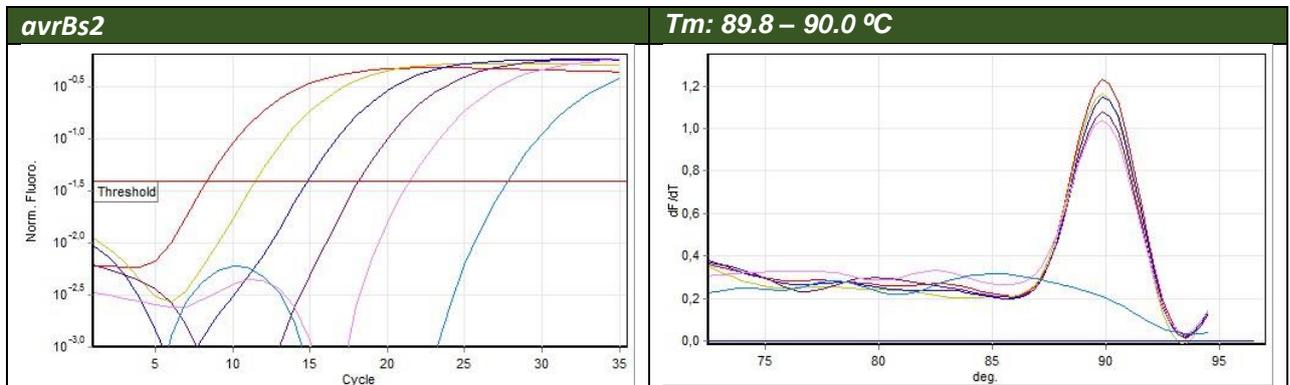
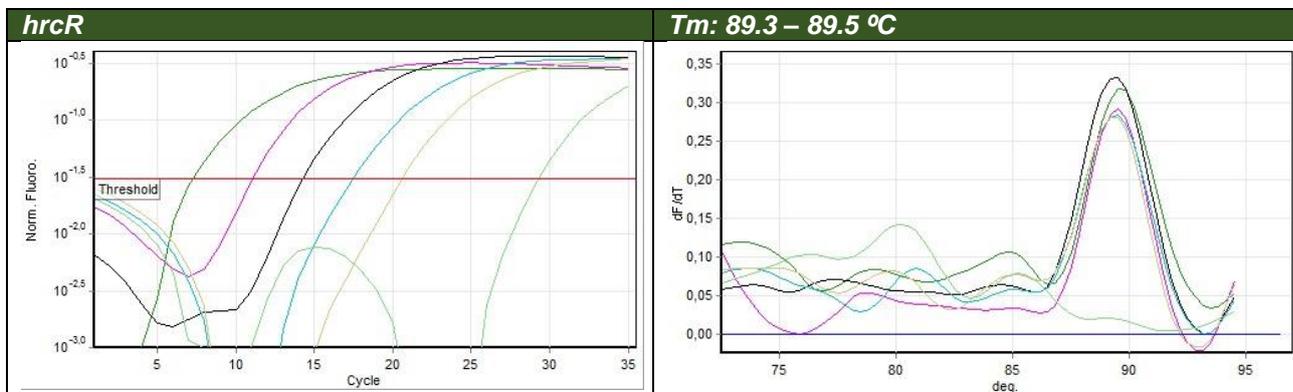
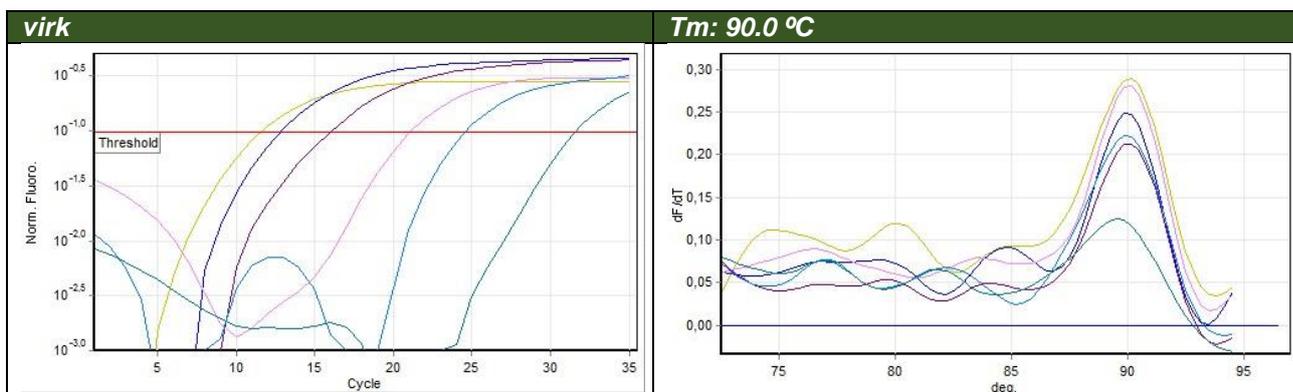
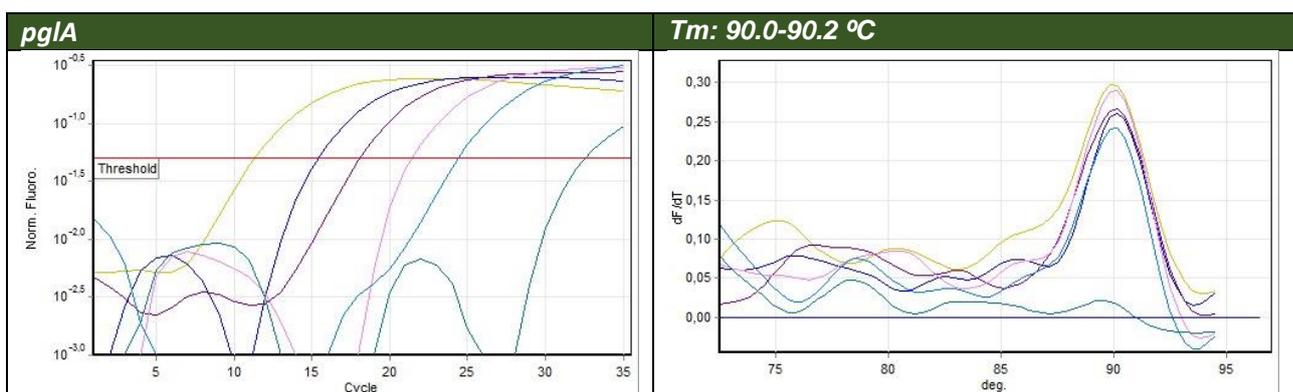
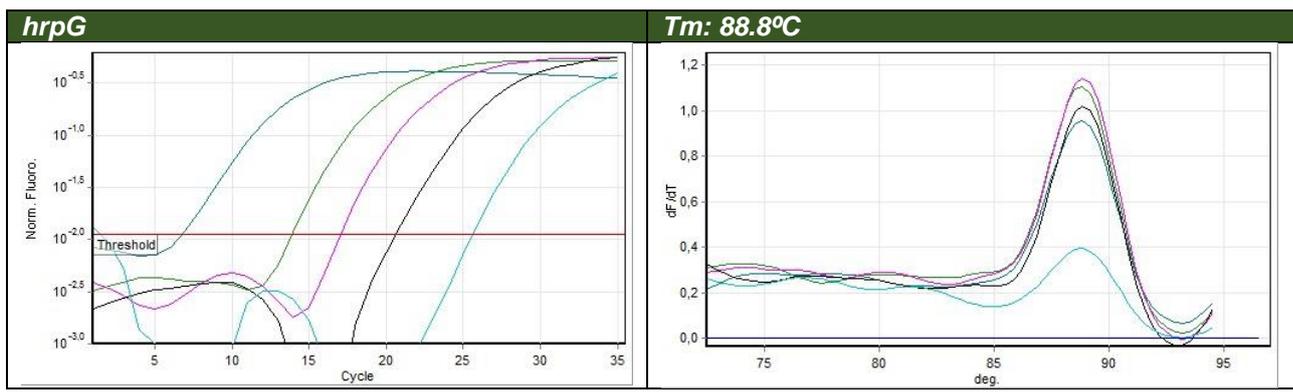
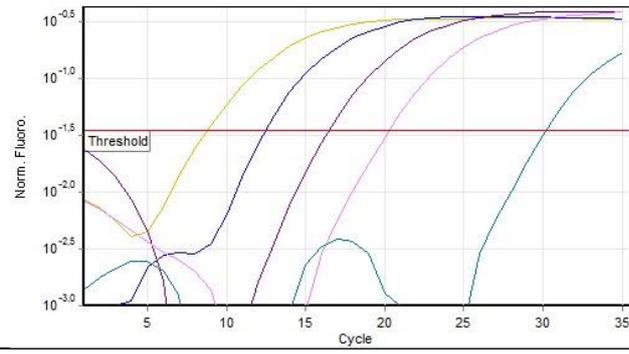


Figura 10. Curvas de amplificación y picos de melting de los genes de patogenicidad.





avrXacE1



Tm: 90.8 – 91.0 °C

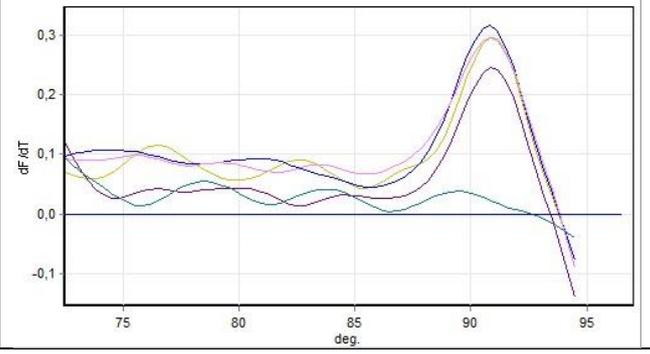


Figura 11. Diluciones de los controles de qPCR para evaluar presencia de inhibición

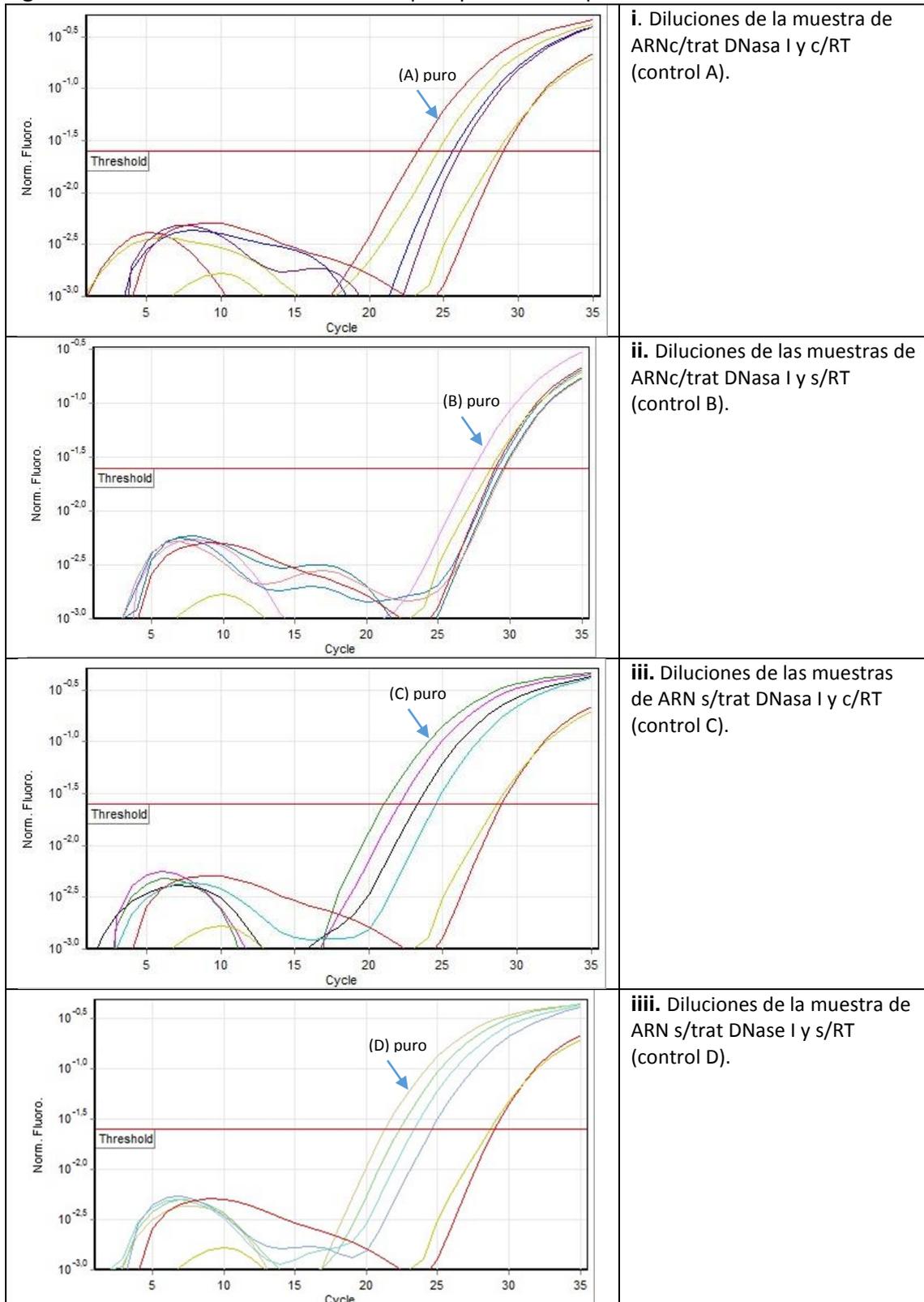


Tabla 9. Concentración de ARN obtenido de Xcc recuperadas de plantas tratadas con Nordox 3X y plantas tratadas con agua (grupo control). Se realizaron 3 repeticiones biológicas.

Muestra	ng/ μ l
Rep 1 Ndx 1d	3.6
Rep 2 Ndx 1d	3.1
Rep 3 Ndx 1d	4.5
Rep 1 agua 1d	3.5
Rep 2 agua 1d	3.3
Rep 3 agua 1d	3.5
Rep 1 Ndx 3d	3.3
Rep 2 Ndx 3d	3.4
Rep 3 Ndx 3d	3.6
Rep 1 agua 3d	4.0
Rep 2 agua 3d	4.5
Rep 3 agua 3d	3.2
Rep 1 Ndx 5d	5.1
Rep 2 Ndx 5d	6.4
Rep 3 Ndx 5d	5.8
Rep 1 agua 5d	5.8
Rep 2 agua 5d	7.3
Rep 3 agua 5d	8.4
Rep 1 Ndx 7d	8.9
Rep 2 Ndx 7d	7.5
Rep 3 Ndx 7d	19.4
Rep 1 agua 7d	30.1
Rep 2 agua 7d	16.2
Rep 3 agua 7d	19.3

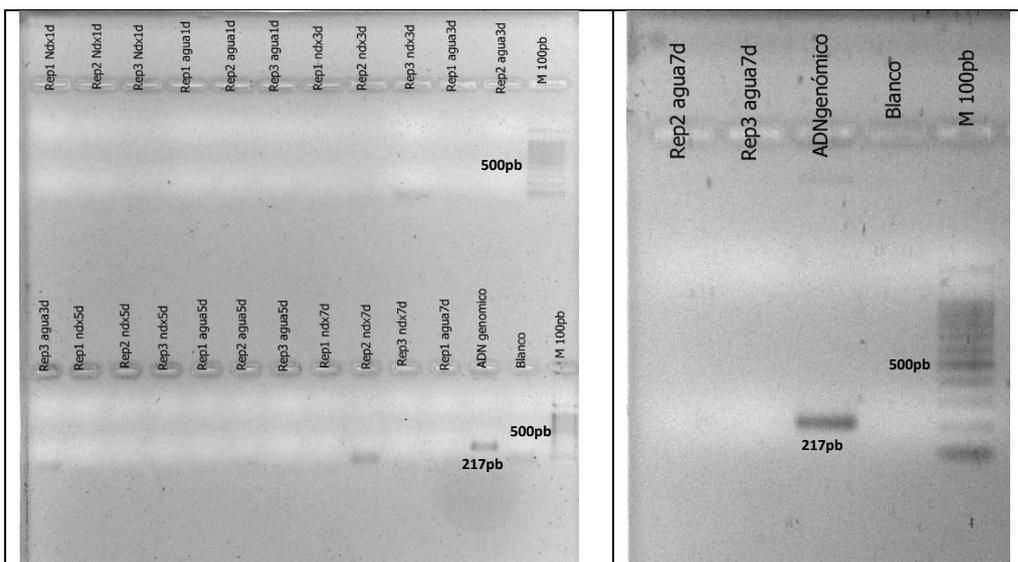


Figura 12. Evaluación de la efectividad del tratamiento con DNasa I en muestras de ARN, en gel de agarosa 2%. Las muestras fueron corridas con ADN genómico como control positivo y un marcador de peso molecular de 100pb ladder (Dongsheng biotech).

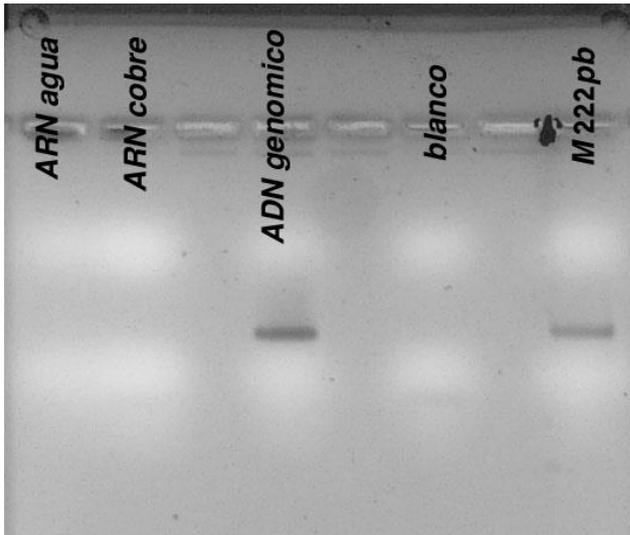
Tabla 10. Resultados de expresión relativa de los genes de patogenicidad en bacterias recuperadas de plantas con Nordox 3x.

GENES	2- $\Delta\Delta C_t$				desvio
	rep1	rep2	rep3	promedio	
hrpG					
5 días	0,55864357	0,21315872	0,12074204	0,29751478	0,13326214
7 días	0,25525303	0,62416527	0,25173889	0,3770524	0,1235606
virk					
5 días	0,67830216	0,7120251	0,47963206	0,62331977	0,07250041
7 días	0,42631745	1,4439292	0,80106988	0,89043884	0,29713831
avrXacE1					
5 días	2,07052985	1,00695555	1,60213976	1,55987505	0,30775385
7 días	1,36604026	1,4640857	1,07922824	1,30311806	0,11546748
avrBs2					
5 días	1,18099266	1,8276629	0,93303299	1,31389618	0,26666969
7 días	1,2397077	501,463192	0,9794203	1,109564	0,10626189
hrcR					
5 días	2,07052985	1,10190512	1,14076372	1,43773289	0,31659727
7 días	0,952638	2,8679105	1,07177346	1,63077399	0,61952357
pgIA					
5 días	0,66896378	0,59049633	0,42337266	0,56094425	0,07241948
7 días	0,57038186	0,97265495	0,97265495	0,83856392	0,13409103

APÉNDICE 5

Determinación de los cambios en la expresión de genes de patogenicidad en células de Xcc que entraron en estado VBNC, luego del tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en ensayos in vitro.

Figura 13. Evaluación del tratamiento con DNasa I de las muestras de ARN obtenidas de la población de Xcc tratadas con CuSO_4 y tratadas con agua.



El gel de agarosa que se muestra corresponde a una repetición biológica. Para las tres repeticiones biológicas realizadas, el tratamiento con DNasa I fue efectivo, obteniéndose el mismo resultado que la figura 13.

Figura 14. Curvas de amplificación de la muestra con CuSO_4 y agua para todos los genes evaluados. Solamente se muestra los resultados de la repetición biológica 1.

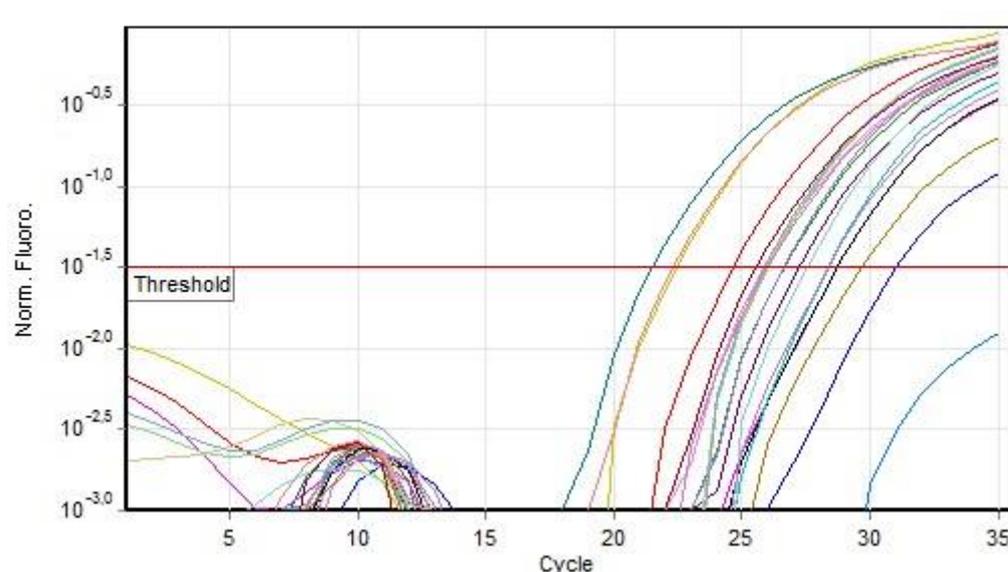


Tabla 11. Cts obtenidos en el análisis de expresión génica para la repetición biológica 1.

Colour	Name	Type	Ct
	Rep1 agua lrp	Unknown	24,65
	Rep1 cobre lrp	Unknown	22,44
	blanco lrp	NTC	31,01
	Rep1 agua virk	Unknown	27,19
	Rep1 cobre virk	Unknown	25,87
	blanco virk	NTC	
	Rep1 agua hrpG	Unknown	21,50
	Rep1 cobre hrpG	Unknown	22,30
	blanco hrpG	NTC	26,62
	Rep1 agua E1	Unknown	28,74
	Rep1 cobre E1	Unknown	28,72
	blanco E1	NTC	28,34
	Rep1 agua Bs2	Unknown	25,94
	Rep1 cobre Bs2	Unknown	26,01
	blanco Bs2	NTC	27,51
	Rep1 agua hrcR	Unknown	25,87
	Rep1 cobre hrcR	Unknown	26,59
	blanco hrcR	NTC	28,36
	Rep1 agua pglA	Unknown	26,00
	Rep1 cobre pglA	Unknown	25,56
	blanco pglA	NTC	29,67

Figura 15. Curvas de melting de las muestras tratadas con CuSO₄ y agua, para todos los genes evaluados.

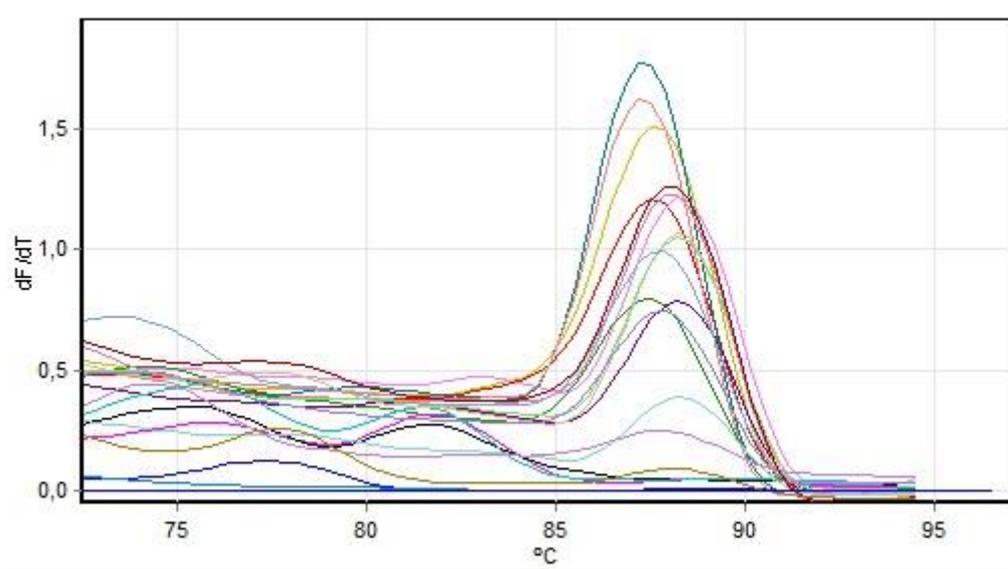


Tabla 12. Picos característicos para cada gen.

No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
1	Red	rep3 agua lrp		87,5	92,7			
2	Yellow	rep3 cobre lrp		78,5	87,5			
3	Blue	blanco lrp		77,3	83,2	89,2		
4	Purple	rep3 agua virk		81,0	88,2			
5	Pink	rep3 cobre virk		75,0	78,2	83,0	88,3	92,7
6	Light Blue	blanco virk		85,0	88,5	93,0		
7	Teal	rep3 agua hrpG		79,7	87,3	92,0	93,5	
8	Light Red	rep3 cobre hrpG		83,5	87,3			
9	Green	blanco hrpG		74,0	87,5			
10	Magenta	rep3 agua E1		75,8	81,7	89,2		
11	Black	rep3 cobre E1		75,5	81,5			
12	Cyan	blanco E1		75,5	81,5	89,5		
13	Olive	rep3 agua Bs2		77,5	88,2			

No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
14		rep3 cobre Bs2		72,7	79,7	88,2	93,0	
15		blanco Bs2		77,7	88,3			
16		rep3 agua hrcR		73,5	83,3	87,7	92,8	
17		rep3 cobre hrcR		73,7	87,8			
18		blanco hrcR		74,3	82,8	87,7		
19		rep3 agua pglA		88,0				
20		rep3 cobre pglA		77,0	88,0			
21		blanco pglA		77,5	84,0	88,0		

Las curvas de cuantificación y de *melting* presentados corresponden a una de las réplicas biológicas. Las 3 réplicas biológicas tienen curvas similares y se obtuvieron los picos específicos para cada producto de amplificación.