



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

**Estudio de la Respuesta de Defensa en Cítricos
Resistentes-Tolerantes a la Cancrosis Bacteriana**

María Alejandra Favaro

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Directores: Dra. María Rosa Marano

Dr. Norberto Francisco Gariglio

Rosario - Argentina

2014

Estudio de la Respuesta de Defensa en Cítricos Resistentes-Tolerantes a la Cancrosis Bacteriana

María Alejandra Favaro

Ingeniera Agrónoma

Universidad Nacional del Litoral

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, y en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, durante el período comprendido entre Abril de 2009 y Enero de 2014, bajo la dirección de la Dra. María Rosa Marano y del Dr. Norberto F. Gariglio.

*A mis padres, que me lo dieron todo
A mis abuelos, por su ejemplo de vida*

...Si pudiera elegir mi paisaje
de cosas memorables, mi paisaje
de otoño desolado,
elegiría, robaría esta calle...
Mario Benedetti

Y aquí termino esta aventura, que comenzó ya hace más de cinco años, casi por casualidad...aquel día que decidí que la investigación era una pasión para mí. Muchas personas y hechos que pasaron por mi vida desde entonces fueron confirmando mis sospechas. Ha llegado entonces el momento de decir GRACIAS.

En primer lugar, a María Rosa, por brindarme un espacio donde casi no había espacio, sin siquiera conocerme, por dejarme volar y volar conmigo, por hacer que cosas difíciles se hagan posibles, por generar en mí la capacidad crítica, por los consejos. ¡Infinitamente GRACIAS! A Norberto, por confiar en mí siempre, por invitarme a participar del maravilloso mundo de la investigación allá por el año 2005, cuando no sabía ni siquiera de qué se trataba, por la paciencia, por el ejemplo y por los consejos también. A ambos, gracias de corazón.

A todas las personas de la Fac. de Ciencias Agrarias de la UNL, que siempre depositaron su confianza en mí, Luis Rista, Lello Herzog, y a Roberto Marano, por contactarme con su hermana sin dudarlo. A mis compañeras de Fitopatología, Roxana Maumary y Margarita Sillón, por la paciencia, por cubrirme en las clases, por siempre impulsarme a progresar. A todo el Depto. de Producción Vegetal.

A Pepe Gadea, por ser mi "tercer" director, por contagiar entusiasmo, por comprometerse con mi trabajo.

A todas las personas mágicas que fue conociendo ni bien llegué a Rosario. Flori, mi primera maestra, gracias por tu paciencia y por enseñarme que "la biología molecular es mágica". Ramón, por compartir conmigo la biotecnología y mostrarme que "no hay nada difícil, sólo hay que seguir los protocolos". Realmente han dejado huellas en mi camino. A Nadia, por brindarme su amistad casi al segundo de haberme conocido, sos una persona maravillosa. A Amalia, por acompañarme desde el principio, por regalarme sus risas. A Roxi, mi sostén en el laboratorio, mi confidente, mi amiga del alma, mi tercera hermana. Sabés que no exagero si te digo que esto no hubiera sido posible sin vos, ¡y estoy feliz que haya sido posible con vos! A Lola, por haberse robado mi corazón cuando yo todavía estaba dudando quién era y qué hacía ahí. Gracias por ser mi desconexión, por prohibir hablar de trabajo en el almuerzo, por tu luz. A todo el equipo de Viro: a Ana Laura; a Germán, por compartir sabiduría; Chouhy, por contagiar paciencia; Clau, por generar alegría; Flor, por derrochar simpatía; Marina, por contagiar conciencia; Sergio, por regalar sonrisas; Fede, por desparramar ocurrencias; Eli, por contagiar inocencia; Pablo, por desatar carcajadas; y Conejo, por completar el esquema. Cuando vine a Rosario nunca pensé que iba a tener la suerte de conocer personas como ustedes, que iba a compartir los momentos hermosos que compartimos, los mates, las risas, las charlas de media mañana y

de medianoche... Si pudiera elegir mi paisaje, elegiría, robaría esta calle, la llevaría conmigo, con cada uno de ustedes... GRACIAS por tanto...

A Daniela, Adriana y Miguel. Gracias a todos por estar siempre, y por acompañarme en mi crecimiento.

A los nuevos integrantes del laboratorio, Sabri, Rodrigo, Ana Paula, y otros no tan nuevos que me acompañaron en la última etapa del doctorado, Dani, Seba, Karina, Celeste y Vero. Gracias por el día a día, por los mates y las charlas. A Pablo Torres, por los momentos compartidos en España, por acompañarme cuando lo necesitaba.

A todos los amigos que me fue regalando la vida, y que cerca o lejos, siempre están conmigo. A los del barrio, a las chicas del secundario, a los de Esperanza... a todos. Estoy feliz que se hayan cruzado en mi camino.

A mi mamá, que incansablemente me acompaña en todo lo que emprendo. A mi papá, por contagiarme su amor por la agronomía y la docencia. A ambos, por acompañarme en mis sueños y en mis sacrificios desde siempre. A mis hermanas, por su apoyo constante. A la familia Díaz, por estar siempre presente.

A Fede, mi amor, mi cómplice y todo... por no dejar que caiga nunca, por tanta paciencia, porque sin vos no hubiera sido posible, por tanto amor. Por lo que ya pasó y por lo que vamos a comenzar. Por todo...

A todos los que de alguna manera u otra contribuyeron con esta Tesis, GRACIAS de corazón...

....Y aquí termino, sin hacer sombra a nadie, ni descuidarme...

Mario Benedetti

El siguiente trabajo de tesis fue llevado a cabo con el financiamiento de las siguientes Becas de Postgrado y Proyectos de Investigación:

- Beca Doctoral CONICET Tipo I, período 2009-2012.
- Beca Doctoral CONICET Tipo II, período 2012-2014.
- Beca PROMAC-POS. Programa de Movilidad Académico Científica Componente Posgrado de la Universidad Nacional del Litoral, 2010, 2011 y 2012.

- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT 2011-1833 “Estrategias Biotecnológicas para el manejo de la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos” (IR: M.R. Marano). PICT 2007-00469 “Utilización de la Genómica Funcional para el Estudio de la Respuesta de *Citrus limon* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*” (IR: M.R. Marano). PICT 2007-00477 “Generación de tecnologías para la diversificación productiva de la zona centro-este de la provincia de Santa Fe (Argentina), mediante la incorporación de especies frutales” (IR: N.F. Gariglio).
- Citrus Research and Education Center (CREC). University of Florida. “Control of Citrus Greening, Canker and Emerging Diseases of Citrus. Providing tools to address HLB and other challenges” (IR: M.R. Marano).
- Universidad Nacional del Litoral. CAI+D 2011 “Cancrosis de los cítricos: Manejo de la enfermedad mediante la selección de cultivares resistentes y estrategias de protección química” (IR: L.M. Rista y M.A. Favaro).

Durante el desarrollo de esta Tesis se han presentado los siguientes trabajos en Revistas y Reuniones científicas:

Trabajos publicados:

- Favaro, M.A.; Micheloud, N.G.; Roeschlin, R.A.; Chiesa, M.A.; Castagnaro, A.P.; Vojnov, A.; Gmitter Jr., F.; Gadea, J.; Rista, L.M.; Gariglio, N.F.; Marano, M.R. 2014. Surface barriers of mandarin cv. 'Okitsu' leaves make a major contribution to canker disease resistance. *Phytopathology*, aceptado con revisión menor.
- Chiesa, M.A.; Siciliano, M.F.; Ornella, L.; Roeschlin, R.A.; Favaro, M.A.; Pino Delgado, N.; Sendín, L.N.; Orce, I.G.; Ploper, L.D.; Vojnov, A.A.; Gadea Vacas, J.; Filippone, M.P.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R. 2013. Characterization of a variant of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* which triggers a host-specific defense response. *Phytopathology* 103:555-564.
- Enrique, R.; Siciliano, F.; Favaro, M.A.; Gerhardt, N.; Roeschlin, R.A.; Rigano, L.; Sendín L.; Castagnaro, A.; Vojnov, A.; Marano, M.R. 2011. Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnology Journal*, 9:394-407. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00555.x

Presentaciones en reuniones científicas:

Internacionales:

- Favaro, M.A.; Roeschlin, R.A.; Yaryura, P.M.; Vojnov, A.; Rista, L.M.; Gadea, J.; Gariglio, N.F.; Marano, M.R. 2013. Las barreras de defensa primarias del mandarino 'Okitsu' son la principal causa de la resistencia a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología, REDBIO 2013, 18-22 de noviembre, Mar del Plata.
- Roeschlin, R.A.; Chiesa, M.A.; Favaro, M.A.; Filippone, P.; Castagnaro, A.; Gmitter Jr., F.; Gadea, J.; Marano, M.R. 2013. Una nueva variante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* reduce el desarrollo del cancro cítrico. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología, REDBIO 2013, 18-22 de noviembre, Mar del Plata.
- Roeschlin, R.A.; Chiesa, M.A.; Enrique, R.; Favaro, M.A.; Torres, P.; Filippone, P.; Gmitter Jr, F.; Vojnov, A.; Castagnaro, A.; Marano; M.R.; Gadea, J. 2012. Characterization of a new *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolate which triggers a host-specific response. International Citrus Congress. 18-23 de noviembre de 2012, Valencia, España.
- Siciliano, M.F.; Chiesa, M.A.; Ornella, L.; Pino Delgado, N.; Favaro, M.A.; Sendín, L.N.; Roeschlin, R.A.; Orce, I.G.; Ploper, L.D.; Vojnov, A.A.; Filippone, M.P.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R. 2012. Analysis of genetic diversity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

strains. Characterization of a new isolate which triggers a host-specific response. International Citrus Congress. 18-23 de noviembre de 2012, Valencia, España.

- Lovera, C.L.; Favaro, M.A.; Ribero, G.G.; Pilatti, R.; Rista, L.M.; Marano, M.R.; Gariglio, N.F. 2012. Efecto de diferentes productos cúpricos y métodos de aplicación sobre la incidencia y severidad de canchros de los cítricos en naranja dulce cv. 'Lanelate' en la zona centro-este de Santa Fe, Argentina. XX Jornadas de Jovens pesquisadores da AUGM (Asociación de Universidades de Grupo Montevideo). 3-5 de octubre de 2012, Curitiba, Brasil.
- Enrique, R.; Siciliano, F.; Favaro, M.A.; Gerhardt, N.; Rigano, L.; Sendín, L.; Castagnaro, A.; Vojnov, A.; Marano, M.R. Manipulation of the defense response to *Xanthomonas* by RNAi in citrus. XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 19 al 23 de Julio de 2009, Québec, Canadá.
- Enrique, R.; Siciliano, F.; Favaro, M.A.; Gerhardt, N.; Rigano, L.; Sendín, L.; Vojnov, A.; Castagnaro, A.; Marano, M.R. Manipulación de la respuesta de defensa a *Xanthomonas* por RNAi en cítricos. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina. II Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. 20-24 de abril de 2009, Rosario, Argentina.
- Pino Delgado, N.; Favaro, M. A.; Siciliano, M. F.; Sendín, L.; Ornella L.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R. Caracterización molecular de un aislado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* inductor de una respuesta de defensa local en limonero. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina. II Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. 20-24 de abril de 2009, Rosario, Argentina.
- Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendin, L.; Pino Delgado, N.; Favaro, M.A.; Roeschlin, R.; Castagnaro, A.; Vojnov, A.; Marano, M.R. Genotipificación de un nuevo aislado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que produce HR en limonero. XIII Reunión Latinoamericana. XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 24 al 27 de setiembre de 2008, Rosario.

Nacionales:

- Cabral, J.; Favaro, M.A.; D'Andrea, R.M.; Chiesa, M.A.; Roeschlin, R.A.; Gadea Vacas, J.; Filippone, M.P.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R.; Esteban, L. 2013. Genome sequencing and comparative analysis of a new variant of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that triggers a host-specific defense response in *Citrus limon*. 4to Congreso de BioInformática y Biología Computacional, 29 al 31 de octubre, Rosario.
- Roeschlin, R.A.; Favaro, M.A.; Chiesa, M.A.; Cabral, J.; D'Andrea, R.M.; Yaryura, P.; Vojnov, A.; Gadea Vacas, J.; Filippone, M.P.; Esteban, L.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R. 2013. Comparative genomic between the variant of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* A_T, that triggers a host-specific defense response, and the virulent reference strain. IX

Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE), 5 al 7 de agosto, Rosario.

- Favaro, M.A.; Roeschlin, R.A.; Amsler, A.; Rista, L.M.; Gadea, J.; Gariglio, N.F.; Marano, M.R. Rol de la cutícula en la resistencia a la cancrrosis de los citrus presente en la variedad de mandarina 'Okitsu'. VIII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2011. 13 al 15 de noviembre de 2011, Buenos Aires.
- Roeschlin, R.A.; Chiesa, M.A.; Favaro, M.A.; Herrero, D.; Filippone, P.; Vojnov, A.; Castagnaro, A.; Gadea Vacas, J.; Marano, M.R. Activación de la respuesta inmune innata durante la interacción de un nuevo aislamiento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* con limonero. VIII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2011. 13 al 15 de noviembre de 2011, Buenos Aires.
- Favaro, M.A.; Roeschlin, R.A.; Chiesa, M.A.; Rougier, F.; Amsler, A.; Vegetti, A.; Rista, L.M.; Gariglio, N.F.; Marano, M.R. Caracterización histológica y bioquímica de hojas de cultivares de mandarina resistentes y susceptibles a la cancrrosis de los citrus. II Congreso Argentino de Fitopatología. 1 al 3 de junio de 2011, Mar del Plata.
- Favaro, M.A.; Roeschlin, R.A.; Rista, L.; Marano, M.R.; Gariglio, N.F. Comportamiento de dos variedades de mandarina frente a cancrrosis. Influencia del método de inoculación, la edad de la hoja y las condiciones de cultivo. XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. 28 de setiembre al 1 de octubre de 2010, Rosario.
- Favaro, M.A.; Roeschlin, R.A.; Rista, L.; Marano, M.R.; Gariglio, N.F. Comportamiento de dos variedades de mandarina frente a cancrrosis. Influencia del método de inoculación, la edad de la hoja y las condiciones de cultivo. IV Jornada de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario. 16 de noviembre de 2010, Rosario.
- Chiesa, M.A.; Favaro, M.A.; Pino Delgado, N.; Siciliano, M. F.; Castagnaro, A. P.; Marano, M. R. **El gen de patogenicidad *pthA* de *Xanthomonas* es necesario pero no suficiente para el desarrollo de la cancrrosis bacteriana de los cítricos en limonero.** IV Jornada de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario. 16 de noviembre de 2010, Rosario.
- Pino Delgado, N; Favaro, M.A.; Siciliano, M.F.; Chiesa, M.A.; Orce, I.G.; Ornella, L.; Castagnaro, A.P. ; Marano, M.R. Estudio bioquímico, genético y molecular de un aislamiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que produce respuesta hipersensible en limonero. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 3 al 5 de diciembre de 2009, Rosario.
- Enrique, R.; Siciliano, F.; Favaro, M.A., Gerhardt, N.; Castagnaro, A.; Vojnov, A.; Marano, M.R. Manipulación de la respuesta de defensa a *Xanthomonas* por silenciamiento de ARN en cítricos. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 3 al 5 de diciembre de 2009, Rosario.

- Enrique, R.; Favaro, M.A., Gerhardt, N.; Siciliano, F.; Sendín, L.; Castagnaro, A.; Vojnov, A.; Marano, M.R. Suppression of callose synthase gene in citrus causes increased susceptibility to *Xanthomonas*. XLV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 10 al 13 de noviembre de 2009, San Miguel de Tucumán.
- Siciliano, F.; Pino, N.; Favaro, M.A.; Enrique, R.; Sendín, L.; Vojnov, A.; Castagnaro, A.; Marano, M.R. Genetic relationship among northwest Argentinian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causing citrus canker. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 8 al 11 de noviembre de 2008, Carlos Paz, Córdoba.

Abreviaturas

A-B

Abs, absorbancia
ADN, ácido desoxirribonucleico
ADNc, ADN complementario
ARN, ácido ribonucleico
ARNm, ácido ribonucleico mensajero
Avr, gen de avirulencia

C-D-E

°C, grado Celsius
CBC, Cancrosis Bacteriana de los Cítricos
C. clementina, *Citrus clementina*
CER, Eceriferum
CER4, Acil-CoA reductasa
CER6, β -cetoacil-CoA sintasa
CER7, factor de transcripción exoribonucleasa 7
CLSM, "Confocal Laser Scanning Microscopy", microscopia láser confocal de barrido
cm, centímetro
C. unshiu, *Citrus unshiu*
CYP86A2, Oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450 de la subfamilia CYP86A2
DO₆₀₀, densidad óptica a 600 nm
dpi, días post-inoculación
ECR, Enoil-CoA reductasa
EPS, exopolisacárido
ETI, "Effector-Triggered Immunity", inmunidad disparada por el efector

F-G

FAE, Elongasa de ácidos grasos
GDSL, Lipasa de la familia GDSL (glicina-ácido aspártico-serina-leucina)
GFP, "*green fluorescence protein*" proteína fluorescente verde
GPAT, Glicerol-3-fosfato acil transferasa
Gm, gentamicina

H-I-J-K

h, horas
hpt, horas post-tratamiento
HR, "hipersensitive response" respuesta hipersensible
kb, kilobase, 1000 pares de bases
KCR, β -cetoacil-CoA reductasa

L-M

l, litro
LACS, Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga
LTP, Proteína de transferencia de lípidos
M, molar
Mb, mega pares de bases
MAH1, Hidroxilasa de alcanos 1
MAMPs, "microbe associated molecular patterns" patrones moleculares asociados a microorganismos
MET, microscopía electrónica de transmisión
min, minutos
ml, mililitros
mm, milímetros

mM, milimolar

MYB30, factor de transcripción MYB30

N-O

ng, nanogramos

nm, nanómetros

P-Q

PAMPs, "*pathogen associated molecular patterns*", patrones moleculares asociados a patógenos

PAS2, β -hidroxiacil-CoA dehidratasa

pb, pares de bases

PCR, "*polymerase chain reaction*", reacción en cadena de la polimerasa

PRRs, "*patterns recognition receptors*"
receptores de reconocimiento de patrones

PTI, "*PAMP-Triggered Immunity*",
inmunidad disparada por PAMPs

pv, patovar

p/v, peso en volumen

qRT-PCR, "*quantitative real time PCR*",
PCR cuantitativa en tiempo real

R-S

R, gen de resistencia

ROS, "*reactive oxygen species*", especies reactivas del oxígeno

rpm, revoluciones por minuto

spp., especies

subsp., subespecie

T-U-V-W

T3SS, "*type III secretion system*", sistema de secreción tipo III

μ l, microlitros

μ g, microgramos

μ m, micrometros

u_{fc}, unidades formadoras de colonias

UV, ultravioleta

v/v, volumen en volumen

VLCFAs, "*very long chain fatty acids*", ácidos grasos de cadena muy larga

WSD1, Sintasa de ceras 1

WIN1, Factor de transcripción inductor de ceras1

X-Y-Z

X. citri, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

X. aurantifolii, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

Glosario

Barreras de defensa: combinación de las características estructurales y reacciones bioquímicas que utilizan las plantas para defenderse de los patógenos y que pueden ser constitutivas (preformadas) o inducibles en respuesta al ataque del patógeno. Estas barreras juegan un rol crucial en combatir el ingreso del patógeno y detener la infección.

Biofilm: Conglomerados de células inmovilizadas en una matriz de polímeros orgánicos de origen microbiano, con polisacáridos extracelulares como principal constituyente, junto con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El desarrollo del biofilm consta de 4 etapas diferentes: i) adhesión de las células a un substrato, biótico o abiótico ii) crecimiento y agregación de las células en microcolonias, iii) maduración y mantenimiento de la arquitectura de las biopelículas y iv) dispersión de las células bacterianas con el fin de colonizar nuevos nichos.

Biótrofo: es aquel microorganismo que requiere tejido vegetal vivo para poder llevar adelante su ciclo de vida completo.

Capacidad de campo: contenido de agua o humedad que es capaz de retener el suelo luego de haber sido mojado abundantemente y dejado drenar libremente.

Ceras: mezcla heterogénea de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs, del inglés *very long-chain fatty acids*) y sus monómeros derivados, con cadenas carbonadas de 20 a 36 C de longitud. Además pueden contener metabolitos secundarios como triterpenoides, fenilpropanoides y flavonoides.

Cutícula: capa hidrofóbica e impermeable que cubre la epidermis de las hojas y otros órganos aéreos de la planta. La estructura y composición de la cutícula varía enormemente entre especies, órganos y estados de crecimiento, pero está principalmente compuesta de una matriz de cutina, embebida con ceras intracuticulares y cubierta con ceras epicuticulares.

Cutina: polímero de ácidos grasos hidroxilados de cadena media (C16 - C18), los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí, y con el glicerol. Entre los ácidos grasos de C16, el ácido 10, 16-dihidroxihexadecanoico y su isómero posicional 9, 16-dihidroxihexadecanoico, constituyen los principales componentes. Solamente una pequeña fracción de la cutina está formada por ácidos grasos de C18.

Efactor: Molécula capaz de desencadenar la respuesta de defensa de una planta. En algunos casos es la proteína codificada por el gen de Avirulencia del patógeno, en otros casos deriva de la actividad enzimática de esta proteína.

Filosfera: comprende tanto la superficie como el interior de las hojas y constituye uno de los nichos más importantes para los microorganismos.

Glabra: hoja sin pelos

Hemibiotrófico: es aquel microorganismo que requiere el tejido vegetal vivo por un período de tiempo pero luego causa la muerte del tejido hospedador.

Hoja dorsiventral: hoja cuyo mesófilo presenta el parénquima esponjoso debajo de la epidermis abaxial y el parénquima en empalizada debajo de la epidermis adaxial.

Idioblasto: célula que es diferente a las que están a su alrededor. Esta diferencia con el resto de células de un tejido puede estribar en su forma, tamaño, contenido o función o en varias de estas. En epidermis de cítricos típicamente se observan idioblastos que contienen cristales de oxalato de calcio.

Interacción compatible: interacción en la cual el hospedador es incapaz de reconocer al patógeno y establecer una respuesta de defensa efectiva. De esta manera, el patógeno es capaz de reproducirse y desarrollar su ciclo de vida completo colonizando los tejidos vegetales. Este tipo de interacción se asocia al término de "susceptibilidad" a ese determinado patógeno.

Interacción incompatible: interacción en la cual el hospedador reconoce la presencia del patógeno. De esta manera, se establece una respuesta de defensa efectiva capaz de limitar

y contener al patógeno en la zona de ingreso impidiendo que se desarrolle la enfermedad. Este tipo de interacción se asocia al término de “resistencia” a ese determinado patógeno.

Necrótrofo: es aquel microorganismo que obligadamente causa la muerte del tejido vegetal para poder desarrollarse y completar su ciclo de vida.

PAMPs/MAMPs: (del inglés “*pathogen-or microbe-associated molecular patterns*”) son moléculas evolutivamente conservadas que están presentes tanto en microorganismos patógenos como no patógenos y muchas veces son esenciales para su sobrevivencia o virulencia.

Patogenicidad: capacidad del microorganismo de causar la enfermedad.

pthA: Gen de patogenicidad perteneciente a la familia génica *avrBs3/pthA*. Se encuentra presente en la bacteria *X. citri* subsp. *citri* y es el responsable de inducir la cancrrosis en los cítricos. El genoma plasmídico de *X. citri* codifica para cuatro alelos de este gen, pero sólo uno es funcional.

Rango de hospedador: Especie o grupo de especies de plantas que pueden servir como hospedadoras para el patógeno bacteriano.

Resistencia cualitativa, vertical o monogénica: resistencia absoluta, controlada por uno o pocos genes, conocidos como genes R. La resistencia ocurre como consecuencia de una interacción incompatible entre el hospedador y el patógeno, y el cultivar generalmente responde desarrollando una HR en el sitio de infección, lo cual conduce a la muerte de las células infectadas con el patógeno y finalmente la planta no desarrolla la enfermedad.

Resistencia cuantitativa, horizontal o poligénica: resistencia parcial, gobernada por varios genes. En los cultivares con resistencia poligénica la sintomatología disminuye cuantitativamente, a pesar de que la enfermedad se manifieste. El gran número de genes que participan en la resistencia horizontal al parecer controlan las diversas etapas de los procesos fisiológicos de la planta, dentro de los cuales se encuentran la formación de estructuras histológicas y celulares de defensa.

Respuesta hipersensible (HR): es un tipo de respuesta que se caracteriza por una muerte celular rápida y localizada en el sitio de la entrada del microorganismo patógeno y por la activación de diferentes mecanismos de defensa. Entre los mismos se identifican: un rápido flujo iónico, generación de especies reactivas del oxígeno, generación de óxido nítrico, activación de quinasas y MAP quinasas y la activación transcripcional de un amplio rango de genes de defensa.

Virulencia: expresión cuantitativa de la patogenicidad de un microorganismo. Es una propiedad característica de cada cepa bacteriana.

Xantano: Polisacárido extracelular producido por *Xanthomonas*.

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Características e importancia de los cítricos	1
1.1.1. Origen y evolución del genoma de los cítricos	3
1.2. Principales enfermedades que afectan a los cítricos en la República Argentina	5
1.3. Cancrosis de los citrus	6
1.3.1. Antecedentes históricos y agente causal	7
1.3.2. Ciclo de la enfermedad	9
1.3.2.1. Infección: Crecimiento epifítico, formación de biofilm e ingreso a los tejidos de <i>X. citri</i>	9
1.3.2.2. Colonización y formación de canchros	10
1.3.2.3. Sobrevivencia y diseminación de <i>X. citri</i>	12
1.3.3. Características generales del genoma de <i>Xanthomonas</i> spp.	12
1.3.4. Manejo de la enfermedad	14
1.4.1. Resistencia a patógenos: múltiples estrategias de defensa constitutivas	15
1.4.1.1. La cutícula	17
1.4.1.1.1. Regulación transcripcional de la deposición de ceras y cutina	22
1.4.1.1.2. Biosíntesis de cutícula en cítricos	23
1.4.2. Resistencia a patógenos: Activación del sistema inmune de las plantas	24
1.5. Resistencia a la canchrosis bacteriana de los cítricos	26
1.6. La canchrosis de los cítricos es una de las principales limitantes del cultivo de cítricos en la Provincia de Santa Fe	28
1.6.1. Comportamiento de cultivares de mandarina frente a canchrosis en la Provincia de Santa Fe	29
2. Objetivo	31
2.1. Objetivo general	31
3. Materiales y Métodos	32
3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	32
3.2. Mediciones de los estados fenológicos del cultivo, e incidencia y severidad de canchrosis a campo	33

3.3. Cepas bacterianas y plásmidos	34
3.4. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación de las cepas bacterianas	35
3.5. Cuantificación de la población bacteriana en un cultivo líquido	36
3.6. Preparación de células electrocompetentes de <i>Xanthomonas</i> spp.	36
3.7. Electroporación y selección de transformantes	37
3.8. Ensayos de patogenicidad de <i>Xanthomonas</i> spp. en condiciones controladas	37
3.9. Medición de la población bacteriana en la hoja	39
3.10. Estudios de adherencia bacteriana	39
3.11. Microscopía e imágenes del desarrollo de un biofilm in vivo	40
3.12. Estudio de las características histológicas de las hojas	40
3.12.1. Cálculo de la densidad y apertura estomática	40
3.12.2. Análisis de la anatomía foliar mediante microscopía óptica	41
3.12.3. Análisis de la anatomía foliar y cambios ultraestructurales inducidos por <i>X. citri</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	42
3.12.4. Cuantificación de ceras cuticulares	43
3.12.5. Medida de la permeabilidad cuticular	44
3.13. Estudio de la expresión génica mediante microdissección de la epidermis abaxial	44
3.13.1. Preparación de bloques de parafina	44
3.13.2. Aislamiento del ARN de los tejidos fijados	45
3.13.3. Microdissección por captura laser	45
3.14. Estudio de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	47
3.14.1. Aislamiento y purificación de ARN para qRT-PCR	47
3.14.2. Tratamiento del ARN total con ADNasaI	48
3.14.3. Síntesis de ADNc a partir del ARN tratado con ADNasaI	48
3.14.4. Cebadores y condiciones térmicas para qRT-PCR	49
3.14.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	51
3.15. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos	52
3.16. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	52
4. Resultados y Discusión	54
4.I. Capítulo I: Análisis de la interacción entre <i>X. citri</i> y los cultivares de mandarino 'Clemenules' y 'Okitsu' a campo y bajo condiciones	54

controladas

4.I.1. Resumen	54
4.I.2. Resultados	56
4.I.2.1. Las evaluaciones a campo demuestran que las hojas de 'Okitsu' presentan un menor período de susceptibilidad a <i>X. citri</i>	56
4.I.2.2. La resistencia a cancrrosis se “quiebra” cuando las hojas de 'Okitsu' son inoculadas con <i>X. citri</i> por el método de infiltración	58
4.I.2.3. <i>X. citri</i> no es capaz de formar una estructura de biofilm sobre la superficie de las hojas de 'Okitsu' durante el período de máxima susceptibilidad	62
4.I.2.4. Las barreras de defensa primarias de 'Okitsu' también protegen a la planta del ingreso de la cepa avirulenta <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C	65
4.I.3. Discusión	67
4.I.3.1. La menor duración del período de susceptibilidad de los brotes de 'Okitsu' podría contribuir al manejo integrado de la cancrrosis en este cultivar	67
4.I.3.2. La resistencia a cancrrosis en el cv. 'Okitsu' depende de la integridad de las barreras superficiales de las hojas	68
4.II. Capítulo II: Análisis de las barreras de defensa de las hojas de 'Okitsu' y 'Clemenules' y su relación con la resistencia a <i>X. citri</i>	72
4.II.1. Resumen	72
4.II.2. Resultados	73
4.II.2.1. La densidad estomática no está asociada a las diferencias en susceptibilidad a <i>X. citri</i> de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu'	73
4.II.2.2. Características histológicas de las hojas de los cultivares 'Okitsu' y 'Clemenules' en diferentes estadios de desarrollo	75
4.II.2.3. Las hojas jóvenes del cv. 'Okitsu' presentan una cutícula de mayor espesor que las hojas de 'Clemenules'	78
4.II.2.4. La cutícula de las hojas jóvenes del cv. 'Clemenules' es más permeable que la de 'Okitsu'	81
4.II.2.5. <i>X. citri</i> no induce estructuras de defensa en las células del mesófilo de 'Okitsu'	83
4.II.3. Discusión	88
4.II.3.1. El desarrollo más rápido de la cutícula de la hoja de 'Okitsu' contribuye a la mayor	88

resistencia a <i>X. citri</i>	
4.II.3.2. Las características morfológicas de los estomas del cv 'Okitsu' reducen el ingreso de <i>X. citri</i>	90
4.II.3.3. <i>X. citri</i> no induce cambios estructurales en las células del mesófilo de 'Okitsu'	91
4.II.3.4. Modelo de resistencia a <i>X. citri</i> en las hojas de Okitsu	92
4.III. Capítulo III: Análisis de la expresión diferencial de genes asociados a síntesis de cutícula entre 'Okitsu' y 'Clemenules' y su relación con el desarrollo del cancro bacteriano	95
4.III.1. Resumen	95
4.III.2. Resultados	96
4.III.2.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes involucrados en la biosíntesis de cutina y ceras cuticulares en los cultivares 'Okitsu' y 'Clemenules'	96
4.III.2.1.1. Análisis de la expresión diferencial de genes a nivel celular, a través de microdissección de la epidermis de mandarina	96
4.III.2.1.1.1. Optimización de un protocolo de preparación de tacos de parafina que permita la posterior extracción de ARN de calidad	97
4.III.2.1.1.2. Microdissección de epidermis abaxial	98
4.III.2.1.1.3. Extracción de ARN a partir del tejido microdisecionado	100
4.III.2.1.2. Análisis de la expresión diferencial de genes en hojas de mandarina a través de qRT-PCR	104
4.III.3. Discusión	109
4.III.3.1. Las propiedades físicas y químicas de la cutícula de las hojas de 'Okitsu' están involucradas en la resistencia a la cancrrosis bacteriana	109
4.III.3.2. La cutícula funciona como una barrera de defensa no sólo pasiva, sino también activa contra patógenos	115
5. Discusión Integradora	118
6. Resumen	121
7. Bibliografía	123

1. Introducción

1.1. Características e importancia de los cítricos

Los cítricos son uno de los cultivos más importantes dentro de la fruticultura mundial, con una producción anual de 87.000.000 de toneladas (t) (<http://www.fas.usda.gov>). La producción citrícola argentina alcanza alrededor de 2.900.000 t anuales, de las cuales 130.000 t corresponden a pomelo, 400.000 t corresponden a mandarinas y sus híbridos, 920.000 t a naranja y 1.450.000 t a limón (<http://www.federcitrus.org>).

Los cítricos son plantas originarias de climas tropicales y subtropicales del Sudeste Asiático (Goldschmidt & Koch, 1996). El rango de temperaturas óptimas para el cultivo de los cítricos se establece entre 23°C y 34°C. Las necesidades hídricas de estos frutales, estimadas según sus pérdidas por evapotranspiración, ronda entre 750 y 1200 mm anuales (Agustí, 2003). En climas templados con estaciones bien definidas, tanto el desarrollo de la planta como el ritmo de las brotaciones están controlados por los cambios estacionales de la temperatura. Así, bajo estas condiciones, los cítricos presentan un período de reposo más o menos profundo causado por el descenso térmico invernal, y brotan uniformemente en la primavera siguiente cuando se eleva la temperatura (Agustí, 2003; Medina *et al.*, 1999). La mayoría de las especies y cultivares de cítricos cultivadas en climas templados presentan tres brotaciones bien definidas en el año. La brotación primaveral es la única que presenta flores que definen la cosecha anual. Por el contrario, las brotaciones de principios y finales de verano excepcionalmente llevan flores que dan lugar a frutos no viables, a excepción del limonero (Agustí, 2003).

Las zonas de producción en Argentina tienen condiciones ecológicas ideales para el desarrollo de la producción de naranjas, mandarinas y sus híbridos, pomelos y limones. En función de las condiciones climáticas y la ubicación geográfica se diferencian cuatro zonas de producción (**Figura 1.1**); la región I – Noreste, ubicada entre los 26° y 32° de latitud Sur (LS), se caracteriza por ser la zona cítrica más tradicional del país, abarca las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Misiones y el centro-norte de Santa Fe; la región II –

Central, ubicada entre los 33° y 35° LS, que corresponde al sector limítrofe entre las provincias de Buenos Aires y Santa Fe; la región III – Noroeste , que se extiende entre los 22° y 29,5° LS, comprende las zonas productoras de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja. Por último, la región IV- Norte, que se extiende entre los 24,5° y 28° LS, e involucra áreas bien definidas de las provincias de Formosa y Chaco (Palacios, 2005).

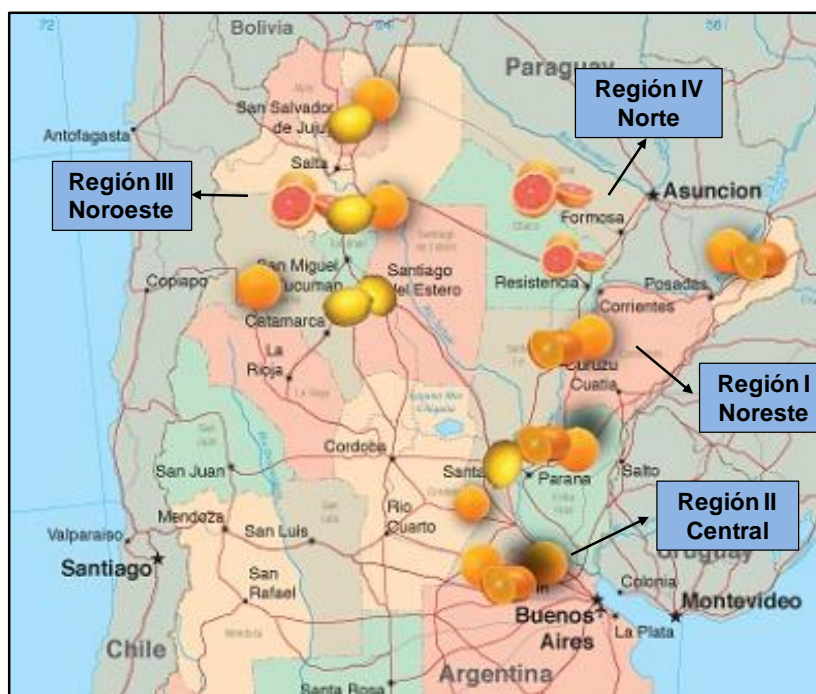


Figura 1.1. Principales zonas productoras de cítricos de la Argentina. Tomado de <http://www.federcitrus.org>.

De acuerdo a la información generada por la Federación Argentina del Citrus, la estructura básica de la actividad cítrica nacional está conformada por 5.300 productores primarios, 20 plantas industriales para jugos concentrados y 440 plantas de empaque entre las cuales existen 112 registradas para exportación. Esta estructura básica genera en conjunto una ocupación directa de aproximadamente 100.000 personas. Los destinos de la producción cítrica nacional son la industria (47%), el mercado interno (32%) y la exportación en fresco (21%). El sector cítrico nacional genera un valor económico anual

de aproximadamente 1400 millones de dólares, de los cuales el 50% corresponde a exportaciones de frutas frescas, derivados y jugos concentrados. Los citrus producidos en Argentina se comercializan en más de 80 mercados, siendo la Unión Europea el más importante (<http://www.federcitrus.org>).

La República Argentina cuenta con un sistema nacional de trazabilidad, que permite a la autoridad nacional fitosanitaria, al productor y al exportador, conocer los tratamientos que se le brindan a cada fruta desde la planta hasta el puerto de destino, lo que permite al importador un alto grado de seguridad respecto al producto que recibe en cuanto a sanidad e inocuidad del mismo (<http://www.federcitrus.org>).

2.1.1. Origen y evolución del genoma de los cítricos

De acuerdo al consenso actual, las especies *Citrus medica* (citrones); *C. reticulata* (mandarinos) y *C. maxima* (pummelos), constituyen los ancestros de la mayoría de los *Citrus* cultivados, llamados especies primarias. Algunos estudios también sugieren la contribución de un cuarto taxón primario, *C. micrantha* (papeda) (**Figura 1.2**). La diferenciación entre estos taxones puede explicarse a través del efecto fundacional de cuatro zonas geográficas diferentes. Las demás especies cultivadas se originaron luego a través de hibridación y de un número limitado de eventos de recombinación sexual a partir de los taxones primarios, por lo cual se consideran especies secundarias. Entre éstas, pueden mencionarse *C. aurantium* (naranja amarga), *C. sinensis* (naranja dulce), *C. paradisi* (pomelo); *C. clementina* (mandarino Clementina), *C. unshiu* (mandarino Satsuma) y *C. limon* (limonero) (**Figura 1.2**). Los cultivares modernos de cítricos tienen por lo tanto un origen interespecífico, y sus genomas pueden considerarse mosaicos de grandes fragmentos de ADN heredados de los taxones básicos (revisado por Ollitrault *et al.*, 2012).

En general, las especies de *Citrus* son diploides, con un número cromosómico básico $x=9$, y genomas relativamente pequeños, de aproximadamente tres veces el tamaño del genoma de *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2013). El International Citrus Genome Consortium (ICGC) presentó en enero del 2011 la secuencia genómica de dos especies de *Citrus*, uno de ellos

basado en la secuencia de un haploide derivado de la mandarina 'Clemenules', y el otro correspondiente al genoma de la naranja dulce diploide 'Ridge Pineapple'. El trabajo del ICGC posibilitó la construcción de un mapa genético para generar el ensamblado del genoma en 9 pseudomoléculas, que representan el número cromosómico básico de los cítricos (Gmitter, 2012). El tamaño del genoma de 'Clementina' resultó ser de 301,4 Mb, mientras que el de naranjo fue de 319 Mb, las secuencias de los mismos están disponibles en el sitio de internet de Phytozome (<http://www.phytozome.net/Clementine>; <http://www.phytozome.net/orange>). Por otro lado, recientemente, ha sido secuenciado el genoma de un doble-haploide originado a partir del naranjo dulce 'Valencia' (Xu *et al.*, 2013) cuya secuencia está disponible en el sitio <http://citrus.hzau.edu.cn/orange>.

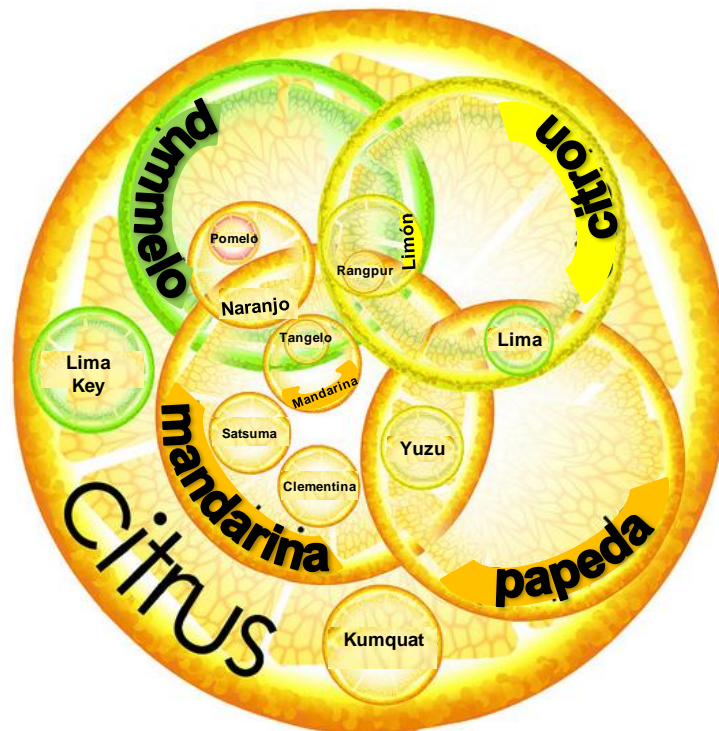


Figura 1.2. Representación esquemática del origen de los cítricos cultivados. Cuatro especies ancestrales (citrón, mandarino, pummelo y papeda) dieron origen a todas las demás a través de hibridación. Cada círculo representa una especie o cultivar, y aquellos que se ubican en la superposición de dos o más círculos se originaron de la hibridación entre estas especies (Imagen provista por F. Gmitter, 2012).

2.2. Principales enfermedades que afectan a los cítricos en la República Argentina

Como se mencionó previamente, la producción de cítricos en Argentina tiene como principal objetivo la exportación de fruta fresca. La exigencia de productos de calidad y sanidad garantizada es cada vez mayor e impacta directamente en la apertura o cierre de los mercados. La conservación y ampliación de los mismos está directamente relacionada con el control de enfermedades causadas por determinados patógenos que no se encuentran presentes, o se encuentran bajo control oficial en los países importadores de frutas frescas. La enfermedad producida por estos patógenos es denominada enfermedad “cuarentenaria” por las restricciones cuarentenarias a los frutos provenientes de áreas infectadas, impuestas por países libres de la enfermedad. En el caso específico de los cítricos, las enfermedades cuarentenarias que mayores problemas causan son la Cancrosis Bacteriana de los Cítricos (CBC), causada por la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), la mancha negra causada por el hongo *Guignardia citricarpa* y la sarna común originada por el hongo *Elsinoe* spp. Los agentes causales de las enfermedades citrícolas causadas por hongos, virus y bacterias se presentan en la **Tabla 1.1**.

Resulta interesante destacar que en la actualidad el Huanglongbing (HLB o ex-Greening), producido por la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. y diseminado por el psílido *Diaphorina citri*, es una de las enfermedades más graves que afectan a la citricultura mundial. El HLB ocasiona graves daños en ramas, hojas y frutos de todas las variedades (de copa o de pie) de cítricos, causando severas pérdidas económicas (Timmer *et al.*, 2000). Esta enfermedad ha sido detectada en el año 2004 en San Pablo, Brasil y desde allí se ha diseminado rápidamente (Teixeira *et al.*, 2008). Para mantener a la Argentina libre de HLB, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) ha tomado diversas medidas como la obligación de denunciar la presencia de síntomas de la enfermedad y la adopción obligatoria del sistema de producción de plantas cítricas bajo cubierta, para evitar la dispersión por el vector. A pesar de ello, en junio del año 2012 se han detectado

casos positivos de HLB en un área fronteriza con Brasil de la Provincia de Misiones. Las plantas positivas fueron inmediatamente erradicadas y comenzaron a realizarse acciones especiales de contingencia en el norte de Misiones, y monitoreos permanentes en todas las provincias cítricas del país (http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File6221-Informe_hlb.pdf).

Tabla 1.1. Principales patógenos que afectan a los cítricos en la Argentina

Agente causal		Enfermedad
Virus	<i>Virus de la tristeza (CTV)</i>	Tristeza
	<i>Virus de la Psorosis de los Cítricos (CPsV)</i>	Psorosis
Viroides	<i>Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd)</i>	Exocortis
	<i>Viroide de la Xiloporosis de los Cítricos (CXVd)</i>	Xiloporosis
Hongos	<i>Phytophthora</i> sp.	Podredumbre del tronco, las raíces y los frutos
	<i>Mycosphaerella citri</i>	Mancha grasienta
	<i>Guignardia citricarpa</i>	Mancha negra
	<i>Elsinoe</i> sp.	Sarna
Bacterias	<i>Xylella fastidiosa</i>	Clorosis variegada de los cítricos
	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Cancrosis de los cítricos
	<i>Candidatus liberibacter</i>	Huanglongbing

1.3. Cancrosis de los citrus

La Cancrosis Bacteriana de los Cítricos (CBC) es uno de los mayores problemas de la producción de cítricos en todo el mundo (Gottwald *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2004; Stall & Civerolo, 1991; Vojnov *et al.*, 2010). Puede reducir drásticamente los rendimientos del cultivo causando defoliación en cultivares susceptibles, y caída prematura de frutos (Pruvost *et al.*, 2002). Sin embargo, las consecuencias más serias surgen del impacto de las

restricciones a la comercialización internacional de fruta desde las áreas afectadas (Gottwald *et al.*, 2002) como es el caso de nuestro país.

1.3.1. Antecedentes históricos y agente causal

La cancrrosis bacteriana de los cítricos es causada por dos grupos de *Xanthomonas* filogenéticamente diferentes, recientemente renombradas como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) y *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (*X. aurantifolii*) (Cubero & Graham, 2004; Schaad *et al.*, 2005; Schaad *et al.*, 2006). Se han descrito diferentes formas de CBC, causadas por distintos subgrupos o variantes de *X. citri* y *X. aurantifolii*, en base al rango de hospedador y distribución geográfica del patógeno (Brunings & Gabriel, 2003; Stall & Seymour, 1983).

La cancrrosis A o Asiática producida por *X. citri*, es la forma más severa y más ampliamente diseminada (Graham *et al.*, 2004). Afecta a un amplio rango de hospedadores dentro de la familia de las Rutáceas, incluyendo a todas las especies de cítricos y varios géneros relacionados (Civerolo, 1984). La constatación más antigua de la enfermedad fue hecha en hojas de *Citrus medica* herborizadas en 1827 provenientes de India (Fawcett & Jenkins, 1933). Sin embargo, la primera descripción de la enfermedad fue en 1915, cuando ingresó a los Estados Unidos (Hasse, 1915). En Argentina los primeros casos se citan en 1969 en Misiones y Corrientes, en 1975 se detectaron los primeros focos en Entre Ríos, y en 1979 en San Pedro (Canteros, 2001). Hacia 1990, luego de varios intentos de erradicación realizados desde 1977, se consideró a la enfermedad como endémica en el Litoral Argentino. El Noroeste Argentino permaneció libre hasta el año 2002, cuando se detectó la enfermedad (Canteros, 2004; Stein *et al.*, 2007). Cabe destacar que en 1996 ingresó a Argentina el insecto conocido como minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) (Canteros, 2004; Stein *et al.*, 2007), el cual incrementó la gravedad de la enfermedad al provocar lesiones en las hojas y ramas jóvenes facilitando el ingreso de la bacteria.

Una nueva variante de *X. citri*, denominada A*, fue identificada en el sudoeste de Asia en el año 1998. Esta cepa se diferencia de *X. citri* tipo A en su rango de hospedador,

que se restringe a la lima mexicana (**Tabla 1.2**) (Brunings & Gabriel, 2003; Vernière *et al.*, 1998). En el año 2000, fue descubierta en Florida (Estados Unidos) otra variante de la cepa tipo A, denominada A^w. Entre sus hospedadores se incluye a la lima mexicana y al portainjerto 'Alemow' (*Citrus macrophylla*) en los que induce los síntomas típicos de la cancrrosis A (Sun *et al.*, 2004). Sin embargo, esta cepa genera una respuesta hipersensible (HR, del inglés *hypersensitive response*) en pomelo y ningún tipo de síntoma en naranjo y limonero (**Tabla 1.2**) (Brunings & Gabriel, 2003). Recientemente, se identificó en nuestro país una nueva variante de *X. citri*, denominada A^T, en el marco de un trabajo en el que se caracterizó la diversidad genética y el grado de virulencia de 42 aislados de *Xanthomonas* spp., obtenidos de síntomas de canchros en diferentes especies de *Citrus* de la provincia de Tucumán (Chiesa *et al.*, 2013). Esta nueva cepa induce un fenotipo clorótico atípico en limonero y pomelo, y canchros débiles en mandarino, hospedador del cual fue aislada (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Patogenicidad relativa de todos los grupos de cepas formadores de canchros en cinco especies de cítricos

Cepa	Naranjo	Pomelo	Limonero	Lima mexicana	Mandarino
<i>X. citri</i> tipo A	+++	++++	+++	++++	++
<i>X. citri</i> tipo A*	-	-	-	++++	No informado
<i>X. citri</i> tipo A ^w	-	HR	-	++++	No informado
<i>X. citri</i> tipo A ^T	No informado	clorosis	clorosis	+	+
<i>X. aurantifolii</i> tipo B	+	+	++	++++	+
<i>X. aurantifolii</i> tipo C	HR	HR	HR	++++	HR

+ cancro débil; ++++ cancro fuerte; - no se generan síntomas; HR respuesta hipersensible

La Cancrosis B o Sud-americana, causada por *X. aurantifolii* tipo B, fue descubierta en Argentina en 1923 (Civerolo, 1984) afectando principalmente a limoneros en el Noreste Argentino, Paraguay y Uruguay. Las cepas tipo B generaban lesiones similares a las causadas por *X. citri* pero más pequeñas, aunque esta bacteria no pudo ser reaislada desde 1975, cuando ingresó a nuestro país *X. citri* A (**Tabla 1.2**) (Canteros, 1996; Chiesa *et al.*, 2013).

La Cancrosis C, causada por *X. aurantifolii* tipo C, ha sido aislada de lima mexicana en una localidad de San Pablo, Brasil, en 1963 (Sun *et al.*, 2004). Los síntomas inducidos en estas plantas son los mismos que los del tipo B. En limoneros, pomelos, naranjos, y mandarinos, se genera en cambio una HR (**Tabla 1.2**) (Chiesa *et al.*, 2013; Cubero & Graham, 2004).

De aquí en adelante, cuando se nombre a la cancrrosis de los cítricos se estará haciendo referencia a la cancrrosis tipo A, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

1.3.2. Ciclo de la enfermedad

1.3.2.1. Infección: Crecimiento epifítico, formación de biofilm e ingreso a los tejidos de *X. citri*

X. citri crece en forma epifítica sobre la superficie de la planta hasta que se den las condiciones óptimas para poder ingresar al espacio intercelular y así desarrollar la enfermedad (Rigano *et al.*, 2007). Este crecimiento está acompañado por la formación de un biofilm (Rigano *et al.*, 2007). Los biofilms microbianos son conglomerados de células inmovilizadas en una matriz de polímeros orgánicos de origen microbiano, con exopolisacáridos (EPS) como principal constituyente, junto con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Branda *et al.*, 2005; Vojnov & Marano, 2014).

La vida en comunidad protege a las bacterias de condiciones ambientales adversas, como ser la desecación, temperaturas elevadas, presencia de antibióticos y compuestos antimicrobianos, además de los mecanismos de defensa del hospedador (Branda *et al.*, 2005; Camilli & Bassler, 2006; Parsek & Fuqua, 2004; Vojnov & Marano, 2014). El xantano, principal EPS secretado por *X. citri* cumple un rol fundamental en la adhesión bacteriana para el posterior desarrollo del biofilm. La formación de biofilm se correlaciona con la patogenicidad de *X. citri* y el desarrollo del cancro bacteriano (Malamud *et al.*, 2011; Rigano *et al.*, 2007; Vojnov *et al.*, 2010).

X. citri es una bacteria hemibiotrófica capaz de infectar frutos, hojas y ramas (Gottwald *et al.*, 2002). La temperatura óptima para el desarrollo de los síntomas es de 28-30°C (Vernière *et al.*, 2003), mientras que las temperaturas bajas ejercen un efecto negativo. Las infecciones de las hojas ocurren principalmente vía estomas y heridas causadas por tormentas, poda, o por insectos como el minador de los citrus (*Phyllocnistis citrella*) (Gottwald *et al.*, 2002; Pruvost *et al.*, 2002). Los hábitos alimentarios del minador facilitan las infecciones de *X. citri*, ya sea a través de la ruptura de la cutícula mediante la excavación de galerías, lo cual provoca una llegada directa de la bacteria al mesófilo de la hoja o a través del transporte de la bacteria por parte del insecto desde tejidos infectados a no infectados (Graham *et al.*, 1996). A su vez, la duración del mojado foliar y la magnitud de la extensión de la capa de agua sobre la hoja influyen sobre la capacidad de la bacteria de ingresar al interior de la cámara subestomática (Christiano, 2006).

Las hojas más susceptibles a la infección de *X. citri* son aquellas que se han expandido entre un 50 a 100% de su tamaño final (Goto, 1992; Gottwald *et al.*, 2002). Por el contrario, tejidos muy jóvenes, con estomas inmaduros, son resistentes a este tipo de infección natural (Gottwald *et al.*, 2002). Luego que las hojas, brotes y frutos alcanzan su tamaño adulto, se forma una cutícula engrosada y éstos se vuelven más resistentes a la infección por estomas (Stall & Seymour, 1983), por eso el efecto de las heridas es particularmente importante en las hojas maduras (Vernière *et al.*, 2003). El período más crítico para la infección en frutos es durante los noventa días posteriores a la caída de los pétalos (Graham *et al.*, 1992a).

La concentración de inóculo necesaria para que *X. citri* consiga colonizar los tejidos varía según el modo de infección. Los niveles mínimos de *X. citri* para inducir el desarrollo de lesiones a través de las heridas y los estomas son de 10^2 y 10^5 ufc/ml, respectivamente (Goodman, 1982; Zubrzycki & Diamante de Zubrzycki, 1987).

1.3.2.2. Colonización y formación de canchros

Una vez en el interior del tejido, las células de *X. citri* se multiplican en los espacios intercelulares envueltas en una matriz de polisacáridos extracelulares (Vojnov & Marano, 2014). Cuando las condiciones son adecuadas, aproximadamente 7 días después de la inoculación, aparecen los primeros síntomas en el envés de las hojas como pequeñas ampollas sobre-elevadas, de aspecto aceitoso o húmedo (Gottwald *et al.*, 2002). Las lesiones consisten en la hiperplasia del tejido del mesófilo que luego evoluciona a pústulas con aspecto eruptivo y corchoso. Tienen color claro o amarillento al principio y luego toman color pardo o marrón, al inducirse la formación de los tejidos suberificados, que dan a las lesiones aspecto elevado en las dos caras de las hojas y con la apariencia de pequeños cráteres (**Figura 1.3**). En los bordes de los canchros, se observa una zona húmeda de apariencia aceitosa, que forma un halo clorótico o amarillento. La ruptura que se produce en la epidermis del tejido vegetal permite que *X. citri* sea eficientemente liberada sobre la superficie de las hojas (Brunings & Gabriel, 2003). Las lesiones en las ramas son similares a las de las hojas pero más chatas y alargadas con un centro necrótico, y son más prominentes en las ramas viejas (**Figura 1.3**). En frutos pequeños, los canchros pueden tener entre 2 y 5 mm de diámetro y pueden unirse unos a otros afectando áreas importantes de la epidermis. La apariencia de las lesiones también es suberificada y crateriforme, pero el halo suele ser menos definido, aunque siempre hay una zona de aspecto húmedo aceitoso en los márgenes de la lesión cuando estas son recientes (**Figura 1.3**). El daño que produce en frutos se limita a la epidermis y en forma parcial al albedo, no llegando a afectar la calidad ni cantidad de jugo.



Figura 1.3. Síntomas de cancrisis en hojas, ramas y frutos de naranjo de ombligo (*C. sinensis*) cv. 'Lanelate'.

1.3.2.3. Sobrevivencia y diseminación de *X. citri*

La bacteria sobrevive principalmente en lesiones de hojas y ramas. Puede sobrevivir unos pocos días en el suelo, y algunos meses en restos de plantas incorporados al suelo (Gottwald *et al.*, 2002). Un equipo de investigación multinacional demostró que los frutos cosechados y desinfectados en planta de empaque, no constituyen una vía a través de la cual el inóculo de *X. citri* pueda infectar plantas sanas y establecer la enfermedad en nuevas áreas (Gottwald *et al.*, 2009; Shiotani *et al.*, 2009).

Las lluvias que causan la acumulación de agua en las hojas y ramas, sumadas a velocidades de viento superiores a los 28 km/h, facilitan la dispersión de la bacteria (Graham *et al.*, 1992b; Serizawa & Inoue, 1975). Esto se explica por el hecho de que una vez que los síntomas se han desarrollado, la bacteria es exudada cuando la superficie de las lesiones se humedece (Timmer *et al.*, 1991; Vernière *et al.*, 2003). En Argentina el inóculo bacteriano dispersado por el viento ha sido encontrado a distancias que superan los 32 m (Stall *et al.*, 1982), pero en presencia de fuertes tempestades, la distancia de dispersión puede ser hasta de 10-15 km (Gottwald *et al.*, 1997).

Debido al clima, en Argentina el ciclo de la enfermedad sufre una discontinuidad durante el invierno (Pruvost *et al.*, 2002). En la provincia de Corrientes, el agua de lluvia recolectada en verano debajo de los árboles infectados con cancrisis presentó 10^5 a 10^6

ufc/ml de *X. citri*, mientras que el tamaño de la población interna de *X. citri* en las lesiones fue de 10^6 a 10^7 ufc/lesión durante la primavera, el verano y el otoño, y cayó drásticamente durante el invierno a 10^2 a 10^4 ufc/lesión (Stall *et al.*, 1980).

1.3.3. Características generales del genoma de *Xanthomonas* spp.

En el año 2002 un consorcio brasileño publicó por primera vez la secuencia del genoma completo de una cepa de *X. citri*, denominada *X. citri* 306 (da Silva *et al.*, 2002). Esta cepa tiene un cromosoma circular de 5,17555- Mb y dos plásmidos: pXAC33 de 33,7-kb y pXAC64 de 64,92-kb. El genoma posee 4.313 marcos de lectura abiertos (ORFs), de los cuales se les ha asignado una función al 62,83%. Ambos genomas plasmídicos codifican para un total de 115 genes y el 50% de los mismos son de función desconocida (Laia *et al.*, 2009). En el año 2010, el consorcio de *Xanthomonas* de San Pablo, Brasil secuenció el genoma completo de *X. aurantifolii* tipo B cepa 11122 y tipo C cepa 10535 (Moreira *et al.*, 2010). Por otro lado, en el año 2013, un grupo de investigación de Florida, Estados Unidos, presentó la secuencia del genoma de *X. citri* A^w cepa 12879 (Jalan *et al.*, 2013). Si bien todas estas bacterias comparten aproximadamente el 80% de los genes identificados, tanto los hospedadores como la especificidad de tejido y la patogénesis que cada una de ellas desarrollan son muy diferentes.

Una característica general de las bacterias fitopatógenas es la producción de factores de virulencia que contribuyen a la interacción con la planta. Entre ellos, en el genoma de *X. citri* 306, el gen *pthA* es esencial para el desarrollo de canchros en los cítricos (Shiotani *et al.*, 2007), al igual que los genes homólogos *pthB* y *pthC* encontrados en *X. aurantifolii* tipo B y tipo C, respectivamente. Los genes *pthA*, *pthB* y *pthC* pertenecen a una familia génica de avirulencia/patogenicidad conocida como AvrBs3/PthA y mutaciones en éstos genes generan cepas incapaces de desarrollar canchros (Al-Saadi *et al.*, 2007; El Yacoubi *et al.*, 2007).

Xanthomonas spp. utilizan una combinación de diferentes sistemas de secreción de proteínas para asegurar el establecimiento de la bacteria y el progreso de la enfermedad

(Preston *et al.*, 2005; Buttner & Bonas, 2009), de los cuales, el de mayor interés es el sistema de secreción tipo III (T3SS, del inglés *type 3 secretion system*) (Buttner & Bonas, 2009). El T3SS consiste en aproximadamente 20 - 25 proteínas diferentes que conforman una maquinaria que protuye por fuera de la bacteria formando una estructura tipo aguja (“inyectisoma”), y permite introducir efectores tipo III, o factores de patogenicidad, entre ellos la proteína PthA, directamente desde la bacteria hacia el interior de la célula hospedadora (Buttner & Bonas, 2002).

1.3.4. Manejo de la enfermedad

El manejo de las enfermedades producidas por patógenos se basa en cuatro principios fundamentales: exclusión, erradicación, protección y resistencia (Agris, 2005). En los lugares donde aparecen nuevos brotes de cancrrosis los programas de erradicación que comienzan rápidamente pueden ser exitosos, pero sólo luego de que un gran número de árboles sea destruido (Gottwald *et al.*, 2002). En algunos lugares como Argentina, Brasil, Uruguay y Florida, los intentos de erradicación han sido poco exitosos y no han podido impedir la expansión de la enfermedad (Koizumi, 1985; Schubert *et al.*, 2001; Stall *et al.*, 1987).

Cuando la enfermedad es considerada endémica, deben ponerse en práctica programas de manejo integrado. En las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones, luego de intentos de erradicación poco exitosos comenzó a practicarse el sistema de “convivencia con la enfermedad”, que consiste en la selección de cultivares poco susceptibles, producción de plantas libres de la enfermedad en viveros, en combinación con pulverizaciones de productos cúpricos y prácticas culturales como plantación de cortinas rompevientos, control del minador de los cítricos y saneamiento de herramientas y equipos. Los factores que integran el plan deben combinarse de manera de poder mantener un nivel de patógeno que no cause pérdidas económicas sin producir grandes

desequilibrios ecológicos (Agostini, 2007). Actualmente es posible producir lotes libres de síntomas para superar las restricciones cuarentenarias (Canteros, 2001).

Las cortinas rompevientos, solas o en combinación con aplicaciones de cobre, son la medida más efectiva para el control de la enfermedad en cultivares susceptibles y reducen su incidencia a niveles no detectables en hojas y frutos en cultivares resistentes (Leite Jr. & Mohan, 1990). La eficacia de las cortinas cada 2-4 ha fue comprobada experimentalmente (Canteros, 2001), aunque también se ha comprobado que no disminuyen significativamente por sí solas los niveles de cancrrosis cuando las plantaciones ya están enfermas (Behlau *et al.*, 2008), por lo cual es necesario combinarlas con las otras medidas de manejo.

Las pulverizaciones con productos cúpricos son efectivas para el control de la cancrrosis cuando se las combina con otros métodos de manejo. Las aplicaciones deben realizarse sólo en los momentos en que hay que proteger a los brotes o a los frutos en formación (Agostini, 2007). En la provincia de Santa Fe se han realizado estudios comparando el bactericida tradicional, oxiclورو de cobre, con productos de nueva formulación, como el sulfato de cobre. La efectividad del sulfato de cobre a las dosis recomendadas fue levemente superior a la del oxiclورو, pero la cantidad de cobre metálico aplicada al cultivo fue significativamente inferior, lo cual resulta de interés debido a que se disminuye la fitotoxicidad en las plantas y la acumulación de cobre en el ambiente (Lovera *et al.* 2012).

Los cultivares resistentes son la mejor solución a largo plazo para el manejo de la cancrrosis (Viloria *et al.*, 2004). Aunque *X. citri* posee un amplio rango de hospedadores en la familia Rutáceas, existen diferencias de susceptibilidad dentro de las especies de *Citrus* (Gottwald *et al.*, 2002). Por su importancia para el desarrollo de esta Tesis de Doctorado, este tema será ampliado en la **Sección 1.5**.

1.4.1. Resistencia a patógenos: múltiples estrategias de defensa constitutivas

Las plantas poseen diferentes mecanismos de defensa, algunos constitutivos (pre-existent) y otros inducibles en respuesta al ataque del patógeno (Raffaele *et al.*, 2009). Los mecanismos de defensa constitutivos responden a la información genética propia de la especie o cultivar vegetal, la cual se expresa normalmente en la planta sin la mediación de un inductor. Estos mecanismos se pueden dividir en estructurales y químicos. Los primeros comprenden básicamente a la producción de capas gruesas de cutícula, deposición de ceras, estructura de la pared celular, presencia de tricomas, número y características estructurales de los estomas (Agrios, 2005; Schumann & D'Arcy, 2006)

La cutícula conforma una capa hidrofóbica e impermeable que cubre la epidermis de las hojas y otros órganos aéreos de la planta (Jetter *et al.*, 2006; Reina-Pinto & Yephremov, 2009). La estructura y composición de la cutícula varía enormemente entre especies, órganos y estados de crecimiento (Heredia, 2003; Reina-Pintó & Yephremov, 2009), pero está principalmente compuesta de una matriz de cutina, embebida con ceras intracuticulares y cubierta con ceras epicuticulares (**Figura 1.4**). Por su importancia para el desarrollo de esta Tesis de Doctorado, este tema será ampliado en la **Sección 1.4.1.1**.

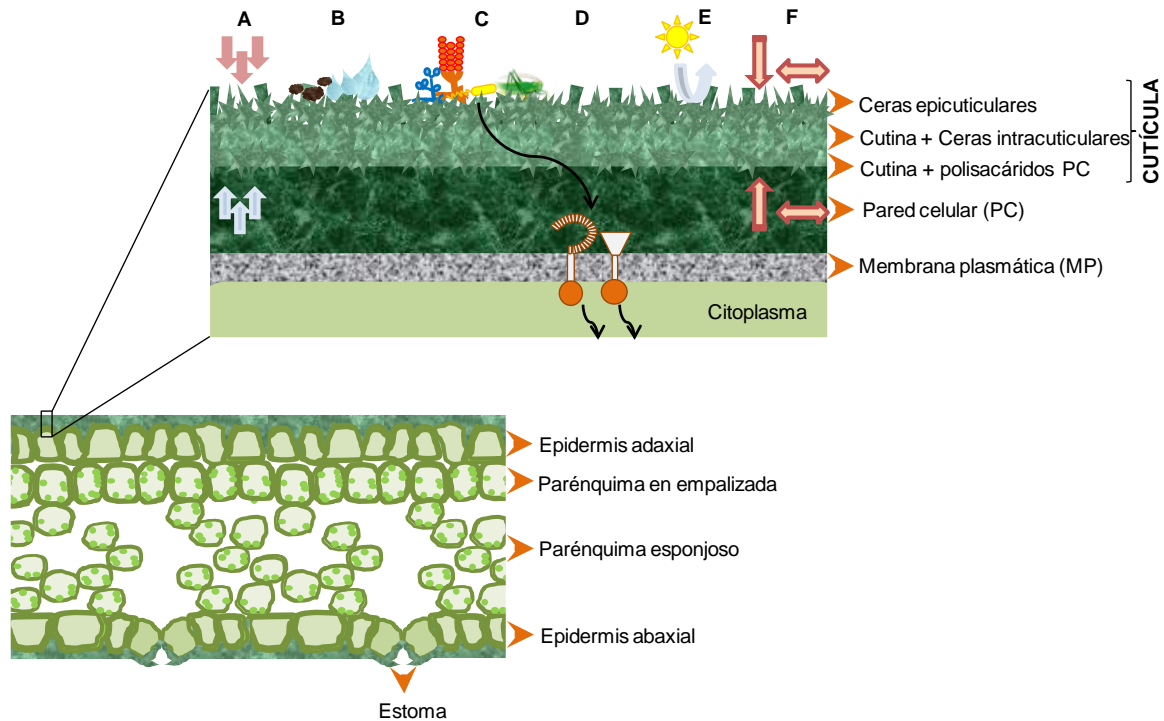


Figura 1.4. Esquema de una hoja mostrando la composición de la cutícula en detalle y las funciones que cumple: A- Reduce la pérdida de agua y permite la difusión de gases. B- Evita acumulación de agua y polvo. C- Participa en las interacciones planta-insecto y planta-patógeno. D- Participa en el reconocimiento de señales de patógenos e insectos para la activación de genes de defensa específicos mediada por receptores de membrana. E- Controla los cambios de temperatura. F- Provee soporte mecánico y participa en la correcta formación de los órganos en las primeras fases de desarrollo de la planta. Los cristales cerosos pueden o no estar presentes dependiendo de la especie. Las ceras epicuticulares constituyen la capa más superficial de la cutícula y cubren la capa conformada por cutina y ceras intracuticulares. En la cercanía de la pared celular la cutina se mezcla con polisacáridos de la pared celular (PC). Adaptado de Pollard *et al.* (2008) y Tafolla-Arellano *et al.* (2013).

La pared celular constituye una segunda barrera efectiva contra los patógenos fúngicos y bacterianos, previniendo el ingreso al interior de la célula vegetal (Agris, 2005; Freeman & Beattie, 2008; Grennan, 2006). Las bacterias no pueden penetrar directamente a través de la epidermis de la planta y por lo tanto ingresan a los tejidos internos a través de aperturas naturales o heridas. Así, los estomas sirven como puerta de entrada durante la infección (Melotto *et al.*, 2006; Melotto *et al.*, 2008). En este contexto, las características de los estomas (densidad y tamaño) y la respuesta estomática (apertura) influyen sobre la

población bacteriana que ingresa a los tejidos internos, lo cual puede determinar la magnitud de la resistencia del hospedador (Wang *et al.*, 2011).

Los compuestos químicos producidos por la planta pueden estar presentes en forma activa o estar almacenados como precursores inactivos en las vacuolas de la célula, en los tricomas o pelos glandulares de la epidermis. Estos compuestos, tóxicos para los patógenos, involucran a tres grandes grupos: i- péptidos y proteínas; ii- metabolitos secundarios: alcaloides, fenoles simples o polifenoles (taninos), aceites esenciales, terpenos (fitoalexinas) e inhibidores de proteasas y iii- productos finales de la ruta biosintética de los fenilpropanoides (Agrios, 2005).

Todos estos obstáculos físicos y bioquímicos pre-existentes se consideran la primera línea de defensa de las plantas, y juegan un rol crucial en combatir el ingreso del patógeno y detener la infección (Agrios, 2005; da Rocha y Hammerchmidt, 2005; Schumann & D'Arcy, 2006; Thordal-Christensen, 2003)

1.4.1.1. La cutícula

A través de la evolución, las plantas terrestres han modificado composicional y estructuralmente la pared celular de su epidermis, formando la cutícula. La cutícula cumple un rol importante en la organogénesis, en el control de intercambio de agua y gases, en la protección contra la radiación UV y el ataque de patógenos e insectos herbívoros (**Figura 1.4**) (Domínguez *et al.*, 2011; Kunst & Samuels, 2009; Tafolla-Arellano *et al.*, 2013; Yeats & Rose, 2013). Además de la superficie externa de la epidermis, la cutícula se extiende también dentro de la cámara subestomática (Esau, 1977), lo cual resulta interesante, debido a que en este sitio es donde residen inicialmente las bacterias luego de penetrar por las aperturas estomáticas (Xiao *et al.*, 2004). Las células oclusivas de los estomas también poseen prolongaciones cuticulares que cumplen una función importante manteniendo el agua fuera de la cavidad subestomática (**Figura 1.4**) (Pollard *et al.*, 2008).

La cutícula cambia y madura a medida que la hoja se hace adulta. Las hojas inmaduras que aún no se han expandido están cubiertas por una fina procutícula, formada por ceras amorfas, no-laminadas. Mientras la hoja se expande, se agregan los diferentes componentes, la cutícula se engrosa y se comienzan a visualizar las láminas que la componen (Jeffree, 1996). La deposición de ceras continúa a medida que la hoja se expande y la cutícula se desarrolla, incrementando el espesor hasta que finaliza la expansión de la hoja (Jeffree, 1996).

A final de la década del 80', Koornneef *et al.* (1989), identificaron visualmente varias plantas con un fenotipo brillante en el tallo, analizando una biblioteca de mutantes de *Arabidopsis*. Análisis químicos y de microscopía electrónica revelaron que los cambios en la reflectancia de las superficies de las plantas se debían a modificaciones en la composición de las ceras. En base a estas observaciones, se identificaron 89 mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la síntesis de ceras que se nombraron como mutantes *eceriferum* (*cer*), haciendo referencia a un menor contenido de ceras. Los investigadores establecieron que las 89 mutantes *cer* estaban afectadas en 21 loci independientes, que definían 21 genes *CER* con una función potencial en biosíntesis, transporte y regulación de ceras (Koornneef *et al.*, 1989). Posteriormente se incorporaron 3 genes *cer* adicionales a esta lista (Rashotte *et al.*, 2004). A lo largo de los últimos veinte años, estudios de genética directa y reversa de las mutantes *cer* y de otras mutantes adicionales de *Arabidopsis* permitieron la caracterización de la vía de biosíntesis de ceras, actualmente muy bien descrita a nivel molecular en esta especie vegetal (Bernard & Joubes, 2013).

Biosíntesis de Ceras: Las ceras consisten en una mezcla heterogénea de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs, del inglés *very long-chain fatty acids*) y sus monómeros derivados, con cadenas carbonadas de 20 a 36 C de longitud. Además, se han identificado ésteres de ceras de cadenas carbonadas de 36 a 70 C (Jetter *et al.*, 2006). Entre los componentes de las ceras también existen metabolitos secundarios como triterpenoides, fenilpropanoides y flavonoides (Jetter *et al.*, 2006).

Los VLCFAs que conforman las ceras cuticulares son sintetizados específicamente en las células epidérmicas por un complejo multienzimático que se encuentra en el retículo endoplasmático, denominado elongasa de ácidos grasos (FAE, del inglés *fatty acid elongase*). Este complejo utiliza como sustrato a los ácidos grasos de 16 y 18 C generados en los plástidos y malonil coenzima A (CoA). FAE realiza un ciclo reiterativo de 4 reacciones catalizadas por β -cetoacil-CoA sintasa (KCS, del inglés *β -ketoacyl-CoA synthase*), β -cetoacil-CoA reductasa (KCR, del inglés *β -ketoacyl-CoA reductase*), β -hidroxiacil-CoA dehidratasa (HCD), y enoil-CoA reductasa (ECR), para producir VLCFAs con 24-36 átomos de C (**Figura 1.5**) (Kunst & Samuels, 2009).

En *Arabidopsis* la enzima KCS es la que limita la tasa de elongación de los ácidos grasos y la longitud de los productos Acil-CoA finales. Debido a que se requieren VLCFAs de diferente número de carbonos, existe una familia de 21 miembros de enzimas KCS en *Arabidopsis* (Millar & Kunst, 1997). Ha sido demostrado que la KCS ECERIFERUM 6 (CER6) es específica y esencial para la formación de VLCFAs mayores a 22 C que componen las ceras en tallos de *Arabidopsis* (Millar *et al.*, 1999). A diferencia de KCS, las demás enzimas que componen el complejo FAE son capaces de formar VLCFAs de variados números de carbonos en diferentes tejidos (Millar & Kunst, 1997). Sólo una copia del gen *ECR*, denominado *ECERIFERUM10* (*CER10*) y del gen *HCD/PAS2*, llamado *PASTICCINO2* han sido encontrados en *Arabidopsis* (Bach *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2005). En contraste, existen dos parálogos de *KCR* en el genoma de *Arabidopsis*, aunque sólo uno de estos genes, *KCR1*, codifica una KCR funcional involucrada en la biosíntesis de VLCFAs. En maíz se identificaron dos KCR involucradas en la biosíntesis de VLCFAs: GL8A y GL8B (Kunst & Samuels, 2009).

En la **Figura 1.5** se muestra la vía de biosíntesis de ceras en *Arabidopsis* y las enzimas que intervienen en este proceso.

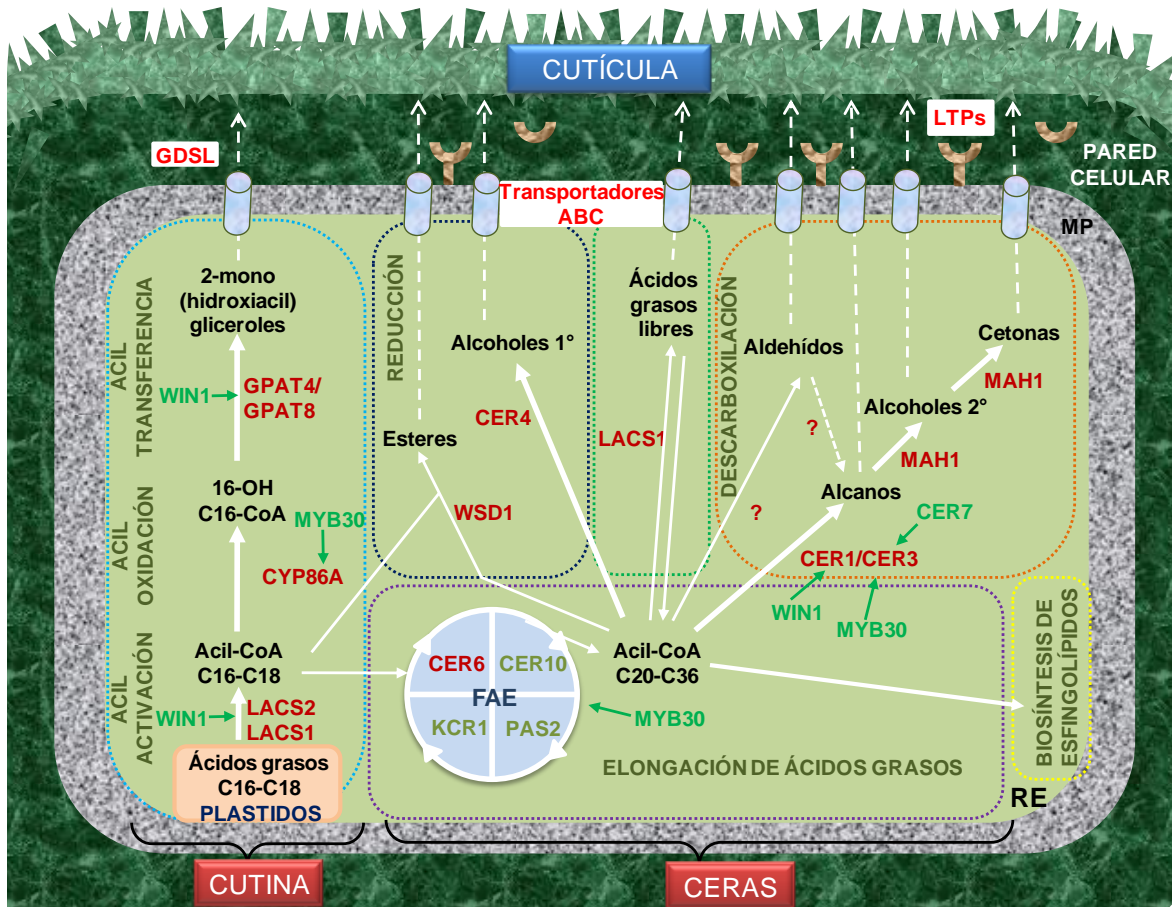


Figura 1.5. Biosíntesis de cutícula en células epidérmicas de *Arabidopsis*. En el sector derecho se muestra la vía biosintética simplificada de generación de ceras, de acuerdo a lo propuesto por Bernard & Joubès (2013) y Raffaele *et al.* (2009). Los acil-CoAs de cadena larga generados por FAE son modificados a través de dos vías en el retículo endoplasmático (RE) de las células epidérmicas para producir VLCFAs alifáticos. Por un lado, la vía de la reducción que produce alcoholes primarios y ésteres de ceras; por otro lado, la descarboxilación que conduce a la formación de aldehídos, alcanos, alcoholes secundarios y cetonas. Los componentes de las ceras son movilizados desde el RE a la membrana plasmática (MP) a través de vesículas, exportados desde la MP a la matriz extracelular por transportadores ABC, y enviados a la cutícula por una maquinaria aún desconocida, que posiblemente implique proteínas de transferencia de lípidos (LTP). En todas las células de la planta, los VLCFAs son los precursores de la síntesis de esfingolípidos. En el sector izquierdo se muestra la biosíntesis de cutina de acuerdo a lo propuesto por Beisson & Ohlgroge (2012). Las enzimas Acil-CoA sintetasas de cadena larga activan los ácidos grasos libres a ácidos grasos Acil-CoA. Posteriormente ocurre la ω -oxidación y por último la transferencia acil. La polimerización de ácidos grasos ocurre extracelularmente y es realizada por miembros de la superfamilia de hidrolasas GDSL. En ambas vías se detallan en rojo las enzimas que intervienen y en verde los factores de transcripción involucrados en la regulación. FAE, elongasa de ácidos grasos; CER6, β -cetoacil-CoA sintasa, KCR, β -cetoacil-CoA reductasa; PAS2, β -hidroxiacil-CoA dehidratasa; CER10/ECR, ϵ -noil-CoA reductasa; CER1 y CER3 eceriferum 1 y 3, respectivamente; CER4, acil-CoA reductasa; LACS1 y LACS2, Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga 1

y 2, respectivamente; MAH1, hidroxilasa de alcanos; WSD1, sintasa de ceras 1; LTP, proteínas de transferencia de lípidos; CYP86A2 oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450 de la subfamilia CYP86A2; GPAT, glicerol-3-fosfato acil-CoA aciltransferasa; GDSL, lipasa de la familia GDSL (glicina-ácido aspártico-serina-leucina); MYB30, factor de transcripción MYB30; WIN1, factor de transcripción inductor de ceras1; CER7, factor de transcripción exoribonucleasa 7.

Biosíntesis de cutina: La cutina se origina a partir de la polimerización de ácidos grasos hidroxilados de cadena media (C16 - C18), los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí, y con el glicerol (Heredia, 2003; Pollard *et al.*, 2008). Entre los ácidos grasos de C16, el ácido 10, 16-dihidroxihexadecanoico y su isómero posicional 9, 16-dihidroxihexadecanoico, constituyen los principales componentes (Bessire *et al.*, 2007). Solamente una pequeña fracción de la cutina está formada por ácidos grasos de C18, entre ellos los ácidos 9, 10-epoxi-18-hidroxi-octadecanoico y 9, 10, 18-trihidroxi-octadecanoico (Heredia, 2003). Debido a los enlaces covalentes entre sus monómeros, la cutina resiste daños mecánicos y forma la estructura básica de la cutícula (Samuels *et al.*, 2008; Stark & Tian, 2006). La caracterización reciente de la cutícula en *Arabidopsis* ha revelado que la cutina también puede contener ácidos α , ω -dicarboxílicos, componentes característicos de la suberina, otro polímero importante en las plantas (Franke *et al.*, 2005; Reina-Pinto & Yephremov, 2009).

La biosíntesis de cutina dentro de las células epidérmicas y su ensamblaje extracelular para formar el biopolímero ha sido sujeto de estudios a lo largo de los últimos años. Sin embargo, la vía de biosíntesis de cutina es mucho más desconocida que la de biosíntesis de ceras (Stark & Tian, 2006).

A partir de plantas mutantes de *Arabidopsis* que muestran defectos en la cutina se han identificado tres familias de enzimas requeridas para la biogénesis del polímero: la Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga LACS2 (del inglés: *long chain acyl-CoA synthetase*), la oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450 de la subfamilia CYP86A2, y dos proteínas aciltransferasas de la familia GPAT (del inglés: *glycerol-3-phosphate acyl-CoA acyltransferase*). La mutación de los dos primeros genes por separado, o del par *GPAT4* y *GPAT8* simultáneamente, produce menores cantidades de cutina en

Arabidopsis (Li *et al.*, 2007; Nawrath, 2006; Pollard *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2004). El orden de las reacciones de acil activación, ω -oxidación de las cadenas acil, y transferencia acil al glicerol para producir los acilgliceroles ha sido sujeto a revisión en los últimos años (Beisson *et al.* 2012; Pollard *et al.* 2008). Las últimas evidencias en *Arabidopsis* sugieren que, en primer lugar las enzimas LACS activan los ácidos grasos libres a ácidos grasos Acil-CoA. Posteriormente, la oxidasa de ácidos grasos CYP86A2, también conocida como ATT1 produce la ω -oxidación. El paso final de transferencia acil es catalizado por GPAT 4 y 8 (**Figura 1.5**) (Beisson *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012).

Un aspecto que todavía necesita ser dilucidado es el mecanismo a través del cual los ácidos grasos y el glicerol se polimerizan para formar la cutina. Isaacson *et al.* (2009) observaron que la cantidad de cutina en frutos de tomate con la mutación en el gen *cutin deficient1 (cd1)* está reducida de 10 a 20 veces. *CD1* codifica un miembro de la superfamilia de enzimas hidrolasas/lipasas con motivo GDSL (glicina-ácido aspártico-serina-leucina), requerida para la síntesis de la cutina del fruto de tomate. Yeats *et al.* (2012) demostraron que esta enzima extracelular sería la poliéster sintasa responsable de la polimerización de los ácidos grasos que forman la cutina (**Figura 1.5**). El 2-mono (hidroaxil) glicerol se acumula en la superficie de las mutantes *cd1*, pero no en la planta salvaje, sugiriendo que las mutantes bloquean el metabolismo de este precursor de cutina. Cabe destacar que en plantas taxonómicamente lejanas como maíz, arroz, soja, vid y *Arabidopsis thaliana* existen secuencias proteicas homólogas a *CD1* (Yeats *et al.*, 2012).

En la **Figura 1.5** se muestra la vía de biosíntesis de cutina en *Arabidopsis* y las enzimas que intervienen en el proceso.

1.4.1.1.1. Regulación transcripcional de la deposición de ceras y cutina

El conocimiento de la regulación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de cutícula es aún escaso (Raffaele *et al.*, 2009; Bernard & Joubès, 2013). Ha sido demostrado que el factor de transcripción MYB30 de *Arabidopsis* es activador transcripcional de los genes que codifican las cuatro enzimas que forman el complejo FAE,

responsable de la biosíntesis de VLCFAs. Además, MYB30 posee otros genes blancos asociados con la biosíntesis de ceras y cutina, como *CER2*, *CER3* y *ATT1* (*CYP86A2*). Notablemente, la expresión temprana de *MYB30* en *Arabidopsis* está asociada con el inicio de la respuesta hipersensible inducida por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Raffaele *et al.*, 2008).

Por otro lado, la exoribonucleasa *CER7* de *Arabidopsis* es un regulador transcripcional que controla la vía de la formación de alcanos para producir las ceras en los tallos. *CER7* es una subunidad del exosoma involucrada en el procesamiento y degradación del ARN. La molécula blanco putativa de esta exoribonucleasa es un microARN que reprime la transcripción del gen *CER3*, clave en la biosíntesis de ceras (Hooker *et al.*, 2007).

Por último, se ha identificado un factor de transcripción tipo ERF (del inglés, *ethylene response factor*) llamado WIN1/SHN1 (del inglés *wax inducer 1*) que activa a los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de cutina, por ejemplo *LACS2* y a los genes de biosíntesis de ceras, como *CER1*, *CER2* y *KCS1* (Broun *et al.* 2004; Kannangara *et al.*, 2007).

1.4.1.1.2. Biosíntesis de cutícula en cítricos

A pesar del extenso conocimiento de las vías de biosíntesis de ceras y cutina en *Arabidopsis* y de los estudios complementarios realizados en otras especies como tomate y maíz (Dietrich *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2012; Sturaro *et al.*, 2005; Vogg *et al.*, 2004; Yeats *et al.*, 2012), las vías de biosíntesis de cutícula en cítricos y en muchas otras especies vegetales continúan siendo desconocidas. En plantas modelo, las mutaciones en genes de biosíntesis de ceras/cutina son inducidas artificialmente, mientras que en plantas perennes leñosas como los cítricos esta metodología resulta difícil de aplicar debido a su heterocigosis y larga juvenilidad. Por lo tanto, las mutaciones generadas espontáneamente en el campo a partir de nuevas yemas juegan un rol importante en el surgimiento de nuevos cultivares.

1.4.2. Resistencia a patógenos: Activación del sistema inmune de las plantas

Los patógenos que logran superar las barreras primarias previamente descritas deben enfrentar aún a la respuesta inmune de las plantas (Freeman & Beattie, 2008; Grennan, 2006). A diferencia de las defensas constitutivas, la respuesta inmune es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios en el metabolismo celular provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa de la planta, es necesario el reconocimiento específico del patógeno.

Actualmente, se sabe que las plantas responden a la infección por microorganismos patógenos usando un sistema inmune innato basado en dos vías de señalización. La primera, usa receptores transmembrana presentes en la célula vegetal (PRRs, del inglés *transmembrane pattern recognition receptors*) que reconocen una molécula patrón (elicitor) asociada al organismo patógeno o microbiano (PAMPs o MAMPs del inglés *pathogen or microbial-associated molecular patterns*) (Jones & Dangl, 2006). En *X. campestris pv. campestris*, los peptidoglucanos y sus derivados muropéptidos, constituyentes de la pared celular, funcionan como MAMPs, elicitando componentes característicos del sistema inmune en *Arabidopsis* (Erbs *et al.*, 2008). Otros MAMPs bacterianos son la flagelina, principal proteína constituyente del flagelo bacteriano; el factor de elongación Tu (EF-Tu); y los lipopolisacáridos (Bent & Mackey, 2007). Así, la percepción de los PAMPs/MAMPs por los PRRs inicia una respuesta de defensa activa, llamada inmunidad basal, resultando en una inmunidad inducida por PAMPs o PTI (del inglés *PAMP-triggered immunity*).

El rápido reconocimiento de los MAMPs/PAMPs, conduce a la activación de una respuesta de defensa de la planta asociada con el cierre de estomas, deposición de calosa y síntesis de lignina en las paredes celulares, activación de quinasas y MAP quinasas, formación de estructuras histológicas y estructurales de defensa, y la activación transcripcional de genes de defensa (Hann & Rathjen, 2007; He *et al.*, 2006). Además, se induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), como anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Grant & Loake,

2000). Esta respuesta de defensa puede detener la colonización del patógeno. Sin embargo, muchos patógenos desarrollaron estrategias altamente especializadas para evitar o suprimir la inmunidad del hospedador y causar la enfermedad (Cui & Harling, 2005; Nomura *et al.*, 2005). En el caso específico de *Pseudomonas syringae* se ha demostrado que produce la fitotoxina coronatina (un análogo a la hormona vegetal ácido jasmónico), la cual interfiere en la vía de señalización del ácido abscísico (Melotto *et al.*, 2006) provocando la re-apertura de los estomas y por consiguiente facilitando su ingreso al tejido vegetal a tiempos tempranos post-infección. Asimismo, Gudesblat *et al.* (2009) demostraron que *X. campestris* pv. *campestris* sintetiza un compuesto difusible, presente en el sobrenadante del medio de cultivo bacteriano, capaz de interferir con el cierre estomático en plantas de *Arabidopsis*, facilitando el ingreso de la bacteria en el hospedador. Otro supresor de la respuesta inducida por PAMPs/MAMPs es el xantano producido por *Xanthomonas* spp. (Enrique *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2006), el cual inhibe la deposición de calosa en la planta hospedadora. Se ha demostrado que el xantano suprime la respuesta inmune del hospedador a través de la absorción de Ca^{+2} , impidiendo de esta manera, el flujo de calcio desde el apoplasto al citosol y suprimiendo así la activación de la cascada de señalización que conduce a la defensa de la planta (Aslam *et al.*, 2008). En consecuencia, la supresión de las defensas del hospedador probablemente sea uno de los principales mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis bacteriana en plantas.

En la segunda vía de señalización participan principalmente las proteínas NB-LRR codificadas por la mayoría de los genes *R*, las cuales responden a efectores específicos del patógeno codificados por genes de avirulencia (*avr*). Muchas bacterias fitopatógenas Gram negativas como *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Ralstonia* usan el T3SS para introducir las proteínas efectoras dentro de las células hospedadoras (Buttner & Bonas, 2009; He & Jin, 2003). La inmunidad inducida por efectores o ETI (del inglés *effector-triggered immunity*) conduce a la muerte programada de la célula vegetal, que generalmente se manifiesta como una HR en el sitio de entrada del microorganismo (Jones & Dangl, 2006).

Es importante destacar que PTI se asocia con lo que se conoce clásicamente como resistencia horizontal, cuantitativa o poligénica, gobernada por varios genes (Boller &

Felix, 2009). Los cultivares con resistencia poligénica presentan una resistencia parcial, por lo cual la sintomatología disminuye cuantitativamente a pesar de que la enfermedad se manifieste. El gran número de genes que participan en la resistencia horizontal al parecer controlan las diversas etapas de los procesos fisiológicos de la planta, dentro de los cuales se encuentran la formación de estructuras histológicas (capas de corcho, capas de abscisión, tílides, etc.) y celulares (depósito de calosa, engrosamiento de la cutícula y pared celular, entre otras estrategias) (Agrios, 2005; Schumann & D'Arcy, 2006). La respuesta ETI es aquella que se conoce clásicamente como resistencia vertical, cualitativa, monogénica o gen por gen (Boller & Felix, 2009). La resistencia monogénica es una resistencia absoluta, consecuencia de una interacción incompatible entre el hospedador y el patógeno, y el cultivar generalmente responde desarrollando una HR en el sitio de infección, lo cual conduce a la muerte de las células infectadas con el patógeno y finalmente la planta no desarrolla la enfermedad. Por el contrario, en los casos en que la interacción entre el hospedador y el patógeno es compatible, el hospedador es incapaz de reconocer al patógeno y de establecer una respuesta de defensa efectiva, por lo tanto se desarrolla la enfermedad, lo cual se asocia al término de "susceptibilidad".

1.5. Resistencia a la cancrrosis bacteriana de los cítricos

La introducción de genotipos resistentes es la mejor solución a largo plazo para el manejo de la cancrrosis (do Amaral *et al.*, 2010; Vilorio *et al.*, 2004). *X. citri* posee un amplio rango de hospedadores dentro de la familia de las Rutáceas, sin embargo existen diferencias de susceptibilidad dentro de esta familia, y entre las especies y cultivares del género *Citrus* (do Amaral *et al.*, 2010; Gottwald *et al.*, 1993; Gottwald *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2001; Vilorio *et al.*, 2004). Por muchos años se han buscado genotipos de *Citrus* y géneros relacionados con algún grado de resistencia cuantitativa a CBC, estableciéndose una extensa clasificación de acuerdo a su grado de susceptibilidad/resistencia (**Tabla 1.3**) que varía ampliamente de acuerdo a los autores y la metodología utilizada para la

evaluación (Das, 2003; Deng *et al.*, 2009; do Amaral *et al.*, 2010; Gottwald *et al.*, 1993; Gottwald *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2001).

Tabla 1.3. Susceptibilidad a *X. citri* en distintas especies de cítricos, sus cultivares y especies relacionadas. Adaptado de Do Amaral *et al.* (2010), Gottwald *et al.* (2002) y Schubert *et al.* (2001).

Altamente susceptibles	Moderadamente susceptibles
Pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) Lima key o mexicana (<i>C. aurantifolia</i>) Lima dulce Palestina (<i>C. limettioides</i>) Naranja trifoliado (<i>Poncirus trifoliata</i>) Naranja de ombligo (grupo Navel) (<i>C. sinensis</i>) Naranja blanca cvs. 'Hamlin' y 'Pineapple' (<i>C. sinensis</i>)	Limonero (<i>C. limon</i>) Naranja amarga (<i>C. aurantium</i>) Naranja blanca, excepto los cvs. altamente susceptibles (<i>C. sinensis</i>) Tangelo (<i>C. tangelo</i>) Pummelo (<i>C. maxima</i>) Mandarino 'Murcott' (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)
Susceptibles	Resistentes
Mandarino (<i>C. reticulata</i>) Pampelmusa o Cimboa (<i>C. grandis</i>) Lima Tahiti (<i>C. aurantifolia</i>) Mandarino Clementina (<i>C. clementina</i>)	Mandarino Satsuma (<i>C. unshiu</i>) Mandarino Cleopatra (<i>C. reshni</i>)
Altamente Resistentes	
Kumquat (<i>Fortunella</i> spp.) Calamandín (<i>C. mitis</i>) Citrón (<i>C. medica</i>) Naranja china (<i>Citrofortunella microcarpa</i>)	

En los últimos años se ha identificado un genotipo de citrón que no muestra ningún síntoma luego de la infiltración con cepas de *X. citri* (Deng *et al.*, 2009) y un cultivar de kumquat que desarrolla una respuesta del tipo HR, que comienza con necrosis y culmina con la abscisión de la hoja (Khalaf *et al.*, 2011). Estos resultados indicarían que en algunos casos existe resistencia cualitativa frente a la canchrosis, pero los trabajos de transcriptómica realizados hasta el presente no han permitido identificar genes específicos de resistencia en los cultivares del género *Citrus* o parientes cercanos estudiados (Cernadas *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009; Khalaf *et al.*, 2007).

1.6. La cancrrosis de los cítricos es una de las principales limitantes del cultivo de cítricos en la Provincia de Santa Fe

El cultivo de frutales es una actividad productiva que requiere de altas inversiones iniciales, seguido por un período improductivo o de baja rentabilidad. Estos factores de riesgo hacen que la decisión de implantación de un monte cítrico sea difícil en zonas donde su producción no esté tradicionalmente arraigada, como es el caso de la zona central de la provincia de Santa Fe.

Frente a estas características de la producción citrícola resulta de crucial importancia conocer cuáles son los cultivares más adecuados a implantar en cada región (Perren, 2008). El éxito económico del proyecto productivo requiere disponer de información referente a la adaptación del material genético a las condiciones agroecológicas zonales. Numerosos estudios fenológicos, fisiológicos y de respuesta a prácticas culturales fueron llevados a cabo por el Grupo de Trabajo de Cultivos Intensivos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, y han demostrado que la zona central de la provincia de Santa Fe presenta condiciones agroecológicas adecuadas para la producción de cítricos (Micheloud *et al.*, 2011; Micheloud *et al.*, 2012; Micheloud, 2013; Pilatti, *et al.*, 2009). También se ha determinado que la cancrrosis de los cítricos es la enfermedad que mayores daños causa en las plantaciones de la provincia. Los cultivares de naranjo y mandarino que resultaron en una mejor adaptación a la región, por su producción y calidad de frutas, son 'Valencia late', 'Salustiana', 'Clemenules' y 'Okitsu' (Micheloud, 2013). Sin embargo, según datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) los cítricos de mayor difusión en la provincia de Santa Fe son las naranjas de ombligo 'New Hall' y 'Lanelate' (<http://www.indec.gov.ar>). El Censo Nacional Agropecuario (2002) registró sólo 504 ha de frutales cítricos en la provincia de Santa Fe, principalmente naranjas (78%) y mandarinas (19%). De éstas, 250 ha están ubicadas en el departamento General Obligado; 120 ha en el departamento Rosario y 70 ha en el departamento San Jerónimo (<http://www.indec.gov.ar>). Para extender la producción de estos frutales, se hace necesaria la difusión de los conocimientos de adaptación de los diferentes cultivares, así

como la información referente al comportamiento frente a las enfermedades más importantes de los cítricos.

1.6.1. Comportamiento de cultivares de mandarino frente a cancrrosis en la Provincia de Santa Fe

En la zona centro-este de la provincia de Santa Fe, se ha notado a campo grandes diferencias en susceptibilidad varietal a cancrrosis. Particularmente, entre los genotipos de mandarino, se ha encontrado que el cv. 'Okitsu' es más resistente al desarrollo del cancro que el cv. 'Clemenules' aunque los mecanismos involucrados en esta resistencia diferencial son desconocidos.

El cultivar 'Okitsu' pertenece al grupo de las mandarinas Satsumas (*Citrus unshiu*), es un fruto fácil de pelar, sin semilla, aún cuando se la cultive cerca de otros cultivares que produzcan polen viable (Cantuarias-Avilés *et al.*, 2009; Shiotani *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2005). Es el cultivar cítrico cuya cosecha ocurre más tempranamente en nuestro país, satisfaciendo la demanda de fruta fresca a partir de principios de marzo, que representa un período de limitada disponibilidad de fruta. Por otro lado, es muy resistente a las bajas temperaturas (Nesbitt *et al.*, 2008), lo cual resulta de interés cuando se la cultiva en climas templados con estaciones bien definidas, como el de la región central de Santa Fe (Köppen, 1936). Un aspecto muy notable de este cultivar es que es considerado resistente a la cancrrosis a campo (Cantuarias-Avilés *et al.*, 2009; Gottwald *et al.*, 2002; Shiotani *et al.*, 2008). El cultivar 'Clemenules', cuya cosecha se produce a partir de abril en nuestro país, pertenece al grupo de las mandarinas Clementinas (*Citrus clementina*), caracterizadas por su excelente calidad organoléptica, ausencia de semilla y fácil pelado (Palou *et al.*, 2008). Lamentablemente, estas cualidades se ven opacadas por su mayor susceptibilidad a la cancrrosis (Gottwald *et al.*, 2002), si bien la fruta normalmente presenta menor intensidad e incidencia de la enfermedad en comparación con las hojas.

En la presente Tesis Doctoral se describen los resultados obtenidos en el análisis de la interacción entre *X. citri* y los cultivares de mandarino 'Clemenules' y 'Okitsu'. En base a

las observaciones efectuadas a campo se comprobó que el cv. 'Okitsu' es más resistente al desarrollo del cancro que el cv. 'Clemenules' y se realizaron estudios biológicos comparativos para confirmar y caracterizar el tipo de resistencia a *X. citri* presente en el cultivar 'Okitsu'.

2. Objetivo General

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral fue caracterizar las bases de la resistencia a *X. citri* en hojas de *C. unshiu* cv. 'Okitsu', utilizando como patosistema susceptible a CBC la especie *C. clementina* cv. 'Clemenules'. Se espera que los conocimientos generados en este proyecto contribuyan al desarrollo de estrategias biotecnológicas para generar cultivares de cítricos resistentes a CBC.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las evaluaciones a campo se realizaron en el Campo Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales (CECIF) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, en Esperanza (31°26'S; 60°56'O, 40 m snm), Santa Fe, Argentina. El clima de la región de acuerdo a la clasificación de Köppen (1936) es subtropical húmedo, sin estación seca. En esta área la temperatura promedio durante los meses más fríos y más cálidos es de 11°C y de 25°C, respectivamente. Las precipitaciones anuales son de 938 mm y ocurren en su mayoría durante la primavera y a principios del verano (entre septiembre y diciembre). La velocidad media anual del viento es de 13,8 km/h y se incrementa desde agosto hasta diciembre, en conjunto con el número de días con tormenta (García *et al.*, 2002).

Para las mediciones a campo se usaron árboles de 10 años de edad de dos cultivares de mandarina (**Tabla 3.1**) injertados sobre pie *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., plantados en un marco de plantación de 5 x 3,5 m en un suelo franco-limoso, con riego por goteo complementario. La fertilización, poda y manejo de plagas fueron realizadas de acuerdo a las prácticas comerciales habituales, incluyendo una cortina rompevientos natural de 15 m de altura rodeando el campo experimental (Gariglio *et al.*, 2009).

Tabla 3.1. Especies vegetales que se escogieron para realizar los distintos estudios.

Espece vegetal	Cultivar comercial	Fuente o referencia
Mandarino (<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan.)	'Clemenules'	Dr. Gariglio (Fac.de Cs. Agrarias, Universidad Nacional del Litoral)
Mandarino (<i>Citrus unshiu</i> Marc.)	'Okitsu'	Dr. Gariglio (Fac.de Cs. Agrarias, Universidad Nacional del Litoral)

Para los ensayos en condiciones controladas, las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento ambientadas con un rango de temperatura entre 20 y 25°C, un fotoperíodo de 16 h de luz/ 8 h oscuridad, y una intensidad lumínica de 150 a 200 $\mu\text{E}/\text{sm}^2$.

3.2. Mediciones de los estados fenológicos del cultivo, e incidencia y severidad de la cancrrosis a campo

Durante la primavera de los años 2009 y 2010 se seleccionaron cuatro ramas jóvenes y sanas a 1,5 m de altura y distribuidas en los cuatro cuadrantes de la copa de los árboles. Los estados fenológicos de brotes y hojas de las ramas seleccionadas se monitorearon desde el inicio de la brotación, en septiembre, hasta noviembre de cada año, usando la escala “Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry” (BBCH) desarrollada para cítricos (Agustí *et al.*, 1997). Se registró la fecha de ocurrencia de los estados BBCH 15 (hojas expandidas en un 50%) y BBCH 19 (hojas completamente expandidas), debido a que a lo largo del período comprendido entre estos dos estadios las hojas de los cítricos son más susceptibles a la cancrrosis. La cuantificación de la enfermedad se realizó en diciembre, cuando los síntomas estaban bien desarrollados. La incidencia se calculó como el porcentaje (%) de hojas con síntomas sobre el total de hojas examinadas, de acuerdo a Leite Jr. *et al.* (1987). La estimación de la severidad fue hecha en las cinco hojas más afectadas de cada rama, utilizando las escalas diagramáticas desarrolladas por Belasque Jr. *et al.* (2005). El desarrollo de los cancrros fue registrado por fotografías digitales. Se usó un diseño experimental completamente al azar, con ocho repeticiones por cultivar. El análisis estadístico de los datos fue realizado de acuerdo al test t de Student ($P < 0,05$). La identidad de las bacterias formadoras de cancrros se confirmó a través de aislamiento y análisis molecular (Chiesa *et al.*, 2013).

3.3. Cepas bacterianas y plásmidos

Los genotipos de las diferentes cepas de *Xanthomonas* y plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis se detallan en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas	Características relevantes	Referencia u origen
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (<i>X. citri</i>)		
<i>X. citri</i> T	Tipo salvaje, origen Tucumán	Chiesa <i>et al.</i> (2013)
<i>X. citri</i> A ^{E28}	Tipo salvaje, origen Esperanza	Este trabajo
<i>X. citri</i> A ^{E28} -GFP	Gm ^R , pPMP2444	Este trabajo
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> (<i>X. aurantifolii</i>)		
<i>X. aurantifolii</i> tipo C	Tipo salvaje, origen Brasil	Dra. Canteros (INTA, Bella Vista)
<i>X. aurantifolii</i> tipo C-GFP	Gm ^R , pPMP2444	Este trabajo
Plásmidos	Descripción	Referencia
pMP2444	pBBR1MCS-5 conteniendo los genes que codifican para la proteína verde fluorescente (<i>egfp</i>).	(Stuurman <i>et al.</i> , 2000)

Para el aislamiento de la cepa *X. citri* A^{E28}, se seleccionaron canchales de hojas de mandarinos cultivados en el CECIF. Se efectuó una punción con una aguja estéril en el margen de avance de la lesión y se realizó un estriado en placas de Petri conteniendo medio NYGA (**Sección 3.4**) (Daniels *et al.*, 1984). Las placas se incubaron en estufa a 28°C por 72 h. Las colonias crecidas presentaron características fenotípicas típicas de *Xanthomonas* spp.: color amarillo-translúcido, aspecto mucoso, configuración redonda, elevación convexa, margen entero y superficie lisa (Chiesa *et al.*, 2013). Algunas colonias se seleccionaron y fueron reaisladas mediante tres repiques consecutivos, posteriormente se conservó la cepa obtenida como se describe en la **Sección 3.4**. Mediante la amplificación específica del gen *xpsD* (Chiesa *et al.*, 2013), componente del sistema de secreción Tipo II de *X. citri*, se comprobó que las colonias aisladas pertenecían a esta especie. Las pruebas de patogenicidad iniciales confirmaron que la cepa A^{E28} producía síntomas similares a otra

cepa de origen tucumano utilizada como referencia en el laboratorio (*X. citri* T). Por lo tanto, de allí en adelante todos los experimentos se realizaron con la cepa de *X. citri* A^{E28}.

3.4. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación de las cepas bacterianas

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 min. Para la preparación de medios sólidos se agregó agar-agar (Britania, Argentina) a una concentración final de 1,5% (p/v). Para las cepas transformadas con el plásmido pMP2444 los medios fueron suplementados con 10 µg/ml de Gentamicina (Gm).

Los células de *Xanthomonas* spp. se cultivaron en medio líquido a una temperatura de 28°C con agitación (250 rpm) durante 15 a 20 h. Para el almacenamiento o mantenimiento a corto plazo, las cepas de *Xanthomonas* se crecieron en medio NYGA o Cadmus-agar, suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas se incubaron en estufa a 28°C durante 2 días y se conservaron a 4°C durante 4 semanas. Para la conservación y almacenamiento a largo plazo, 800 µl de un cultivo líquido crecido en NYGB durante 15 a 20 h se mezcló con 200 µl de glicerol estéril y luego se conservó a -80°C (Sambrook *et al.*, 1989). A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo utilizados.

Composición de los medios

- **Cadmus:** medio rico líquido para *Xanthomonas* (tripteína bacteriológica, 5 g/l; extracto de levadura, 3 g/l; extracto de malta, 3 g/l; glucosa, 20 g/l) (Cadmus *et al.*, 1976).

- **Cadmus-agar:** medio rico sólidos para *Xanthomonas* (Cadmus en 1,5% (p/v) agar-agar).

- **NYGB:** medio rico líquido para *Xanthomonas* (tripteína bacteriológica, 5 g/l; extracto de levadura, 3 g/l; glicerol, 20 g/l) (Daniels *et al.*, 1984).

- **NYGA:** medio rico sólido para *Xanthomonas* (NYGB en 1,5% (p/v) agar-agar).

3.5. Cuantificación de la población bacteriana en un cultivo líquido

El número de células bacterianas en cultivo líquido se estimó espectrofotométricamente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) y con un camino óptico de 1 cm (Spectronic[®] 20Genesys[™] spectrophotometer, Thermo Electron Corporation). Los cultivos densos se diluyeron por un factor de 10 para obtener una medida precisa. Para *Xanthomonas* spp., una absorbancia de 0,3 corresponde aproximadamente a 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (ufc/ml).

3.6. Preparación de células electrocompetentes de *Xanthomonas* spp.

Con el objetivo de preparar células electrocompetentes para transformar con el plásmido pMP2444, las cepas bacterianas de *X. citri* y *X. aurantifolii* se cultivaron a 28°C con agitación (250 rpm) durante 15 a 20 h en medio NYGB. Posteriormente, se diluyó 1 ml del cultivo en 50 ml de medio NYGB y se incubó nuevamente en agitación a 28°C, hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Tras dejar enfriar en hielo durante 15 min, las células se centrifugaron durante 10 min a 5.000 rpm y a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de glicerol 10% (v/v) estéril preenfriado. Se repitieron dos rondas de centrifugación y resuspensión en glicerol. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 200 µl de glicerol 10% (v/v) estéril y se dividió en tubos eppendorf que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

3.7. Electroporación y selección de transformantes

Las células electrocompetentes de *X. citri* y *X. aurantifolii* se transformaron por electroporación con el plásmido pMP2444 que expresa la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) utilizando la metodología descrita por do Amaral *et al.* (2005). Se colocaron 40 μ l en una cubeta de electroporación estéril (BioRad, Hercules, EE.UU.) mantenida en hielo y se adicionó 1 μ g de plásmido. Inmediatamente se electroporó en un electroporador BioRad (Gene Pulser®, EE.UU.) aplicando una intensidad de campo eléctrico de 12,5 kV/cm con una duración del pulso de 2,7 ms. Luego se agregó 1 ml de medio Cadmus, y se incubó 1 h a 28°C con agitación, para permitir la expresión de los caracteres fenotípicos adquiridos, previos a la selección con antibióticos. La selección de los clones transformados se realizó por crecimiento de aproximadamente 50 μ l de células transformadas en medio Cadmus-agar a 28°C suplementado con el antibiótico adecuado durante 48 h. Las bacterias transformadas con GFP se utilizaron luego para los estudios de desarrollo de biofilm y patogenicidad bacteriana.

3.8. Ensayos de patogenicidad de *Xanthomonas* spp. en condiciones controladas

Se cultivaron células bacterianas en medio Cadmus conteniendo el antibiótico adecuado, con agitación permanente a 28°C hasta saturación del cultivo. Se centrifugó a 7.500 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió en una solución 10 mM MgCl₂ a una concentración de 10³ y 10⁷ ufc/ml.

Las plantas de ambos cultivares de mandarino se podaron para forzar la brotación en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura. Se seleccionaron brotes de 5 o más hojas, que se consideraron de la misma edad. Las inoculaciones de *X. citri* para cuantificación de canchales se realizaron de acuerdo a Stall *et al.* (1982), inoculando la bacteria a los 15, 18, 22, 25 y 27 días de seleccionados los brotes, comenzando por la hoja más alejada del ápice. Para la inoculación se utilizaron diferentes métodos según el ensayo:

Infiltración: se introduce el inóculo bacteriano en la cara abaxial de las hojas por presión mecánica, usando una jeringa de 1 ml sin aguja. La zona infiltrada de la hoja se delimita con un fibrón indeleble para luego calcular la superficie del área infiltrada. Para este método se utilizó una concentración de inóculo de 10^3 ufc/ml. Esta concentración es la óptima para monitorear desarrollo de resistencia en hojas de citrus, dado que las lesiones no confluyen formando “water soaking” y de ésta forma se pueden individualizar y contar (Stall *et al.*, 1982).

Aspersión: utilizando un atomizador se rocía el inóculo sobre la superficie foliar, principalmente sobre la cara abaxial por su mayor número de estomas. Este método de inoculación es el que se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza, ya que las bacterias sólo pueden ingresar al mesófilo por los estomas. Para este método se utilizó una concentración de inóculo de 10^7 ufc/ml, dado que la cantidad de bacterias necesaria para que ocurra la infección por estomas es mayor (Zubrzycki & Diamante de Zubrzycki, 1987).

Independientemente del método de inoculación utilizado, las hojas inoculadas se recubrieron con una bolsa de nylon previamente humedecida con agua estéril para mantener la humedad relativa del ambiente cerca a la saturación, y así favorecer el desarrollo de la enfermedad. Las plantas se transfirieron nuevamente a la cámara de crecimiento en condiciones ambientales controladas, con un rango de temperatura entre 25 y 30°C, humedad ambiente alta y un fotoperíodo de 16 h de luz/ 8 h oscuridad. Todas las inoculaciones involucraron un mínimo de dos brotes por cada planta y cuatro plantas por cada cultivar y método de inoculación analizado. El progreso de la enfermedad fue monitoreado fenotípicamente en tres ensayos biológicos separados y el número de canchales/cm² se cuantificó 30 días post- inoculación (dpi) usando el programa Image J v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Los datos fueron analizados estadísticamente de acuerdo al test t de Student ($P < 0,05$).

Las inoculaciones con *X. aurantifolii* en hojas de 18 días de edad se realizaron siguiendo la misma metodología, y la sintomatología desarrollada se registró utilizando lupa de fluorescencia (Olympus mvx10 Fluorescence MacroZoom, Japón).

3.9. Medición de la población bacteriana en la hoja

Para determinar la población bacteriana, se inocularon hojas de mandarina por los dos métodos de inoculación previamente descritos (**Sección 3.8**) y se cortaron discos de hojas de aproximadamente 1 cm² en la zona inoculada a diferentes tiempos post-inoculación. Los discos se sumergieron en 500 µl de una solución 10 mM MgCl₂ y las células bacterianas se liberaron a la solución por la homogenización del tejido con un palillo plástico estéril. Posteriormente, se plaquearon en medio NYGA diluciones seriadas de la suspensión para estimar el tamaño total de la población bacteriana (endofítica y epifítica). Cada tiempo de toma de muestra se realizó por triplicado.

3.10. Estudios de adherencia bacteriana

La adhesión bacteriana en las caras abaxiales de las hojas de ambos cultivares de mandarina se evaluó a través de la tinción con cristal violeta (Rigano *et al.*, 2007). Para ello, se crecieron las células de *X. citri* en las condiciones descritas anteriormente (**Sección 3.4**). Se cortaron discos de hojas de 18 días de brotación de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu' de aproximadamente 35 mm² que se montaron en cajas de Petri, con la cara adaxial hacia abajo. Inmediatamente, se agregó sobre los discos de hojas 3 ml del cultivo bacteriano a una concentración de 10⁷ ufc/ml. Se incubó sin agitación a 28°C durante 1, 5 y 24 h. Cumplido el tiempo de incubación, los discos de hojas fueron lavados tres veces con H₂O destilada estéril. Posteriormente, se calentaron a 60°C por 20 min para permitir que se fijen las bacterias adheridas. Los discos de hojas se incubaron durante 45 min utilizando 3 ml de una solución de cristal violeta 30% (p/v), y finalmente se lavaron tres veces con H₂O destilada estéril para remover el exceso de colorante. La proporción de bacterias teñidas de color violeta, adheridas a la superficie de la hoja, se examinó bajo luz blanca utilizando un microscopio óptico (BX50F4, Olympus, Japón).

3.11. Microscopía e imágenes del desarrollo de un biofilm in vivo

Se inocularon hojas de los cultivares de mandarina 'Okitsu' y 'Clemenules' utilizando el método de aspersión con la bacteria *X. citri*-GFP (10^7 ufc/ml) (Sección 3.8). A diferentes tiempos post-inoculación, se cortaron áreas de aproximadamente 1 cm² de la parte media de las hojas y se montaron sobre portaobjetos con la cara abaxial hacia arriba. El crecimiento epifítico se monitoreó con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50F4, Japón) y la formación de biofilm se examinó con un microscopio confocal invertido (CLSM, del inglés *confocal laser scanning microscope*, C1 Eclipse TE-2000-E2, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EE.UU.). Mediante el programa Nikon EZ-C1 3.9 Free Viewer se generaron imágenes tri-dimensionales y secciones. El experimento fue repetido en tres plantas diferentes para cada cultivar, y se examinaron tres hojas diferentes por planta.

3.12. Estudio de las características histológicas de las hojas

3.12.1. Cálculo de la densidad y apertura estomática

Para calcular el número de estomas por unidad de superficie se utilizó la técnica de la impresión de la epidermis (Bastos Segatto *et al.*, 2004). Se colocó una gota de adhesivo instantáneo universal (cianoacrilato) sobre un portaobjeto. La cara abaxial de hojas de mandarina se presionó a cada lado de la parte media del folíolo contra el portaobjeto durante aproximadamente 1 min para facilitar su adhesión al mismo. Una vez seco el adhesivo, se separó la hoja del portaobjetos quedando la impresión de la epidermis. El cálculo de la densidad estomática se realizó determinando el número de estomas observados con microscopio óptico (Olympus BX50F4, Japón) en un área de 4,34 mm², equivalente al diámetro del campo observado con el objetivo de 40X de acuerdo a Cañizares *et al.* (2003). Por cada cultivar se analizaron 5 hojas, de las cuales se observaron dos campos seleccionados al azar.

Por otro lado, se realizaron diferentes tratamientos con el objetivo de estudiar la respuesta estomática en ambos cultivares de mandarina. Previamente al comienzo de los experimentos, las plantas se regaron hasta lograr la capacidad de campo, se mantuvieron en cámara de crecimiento con una intensidad de luz de 150 a 200 $\mu\text{E/s/m}^2$, 70% de humedad relativa y un rango de temperatura de 25 a 28°C durante al menos 3 h para asegurar la apertura de la mayoría de los estomas. Posteriormente, hojas de 18 días de brotación de ambos cultivares se inocularon por aspersión con *X. citri* en una concentración de 10^7 ufc/ml. Como controles de cierre y apertura estomática, hojas de otras plantas se asperjaron con 10 μM ácido abscísico (ABA) y 10 mM MgCl_2 respectivamente, de acuerdo a Melotto *et al.* (2006). Luego de 1 y 4 horas post-tratamiento (hpt), se obtuvieron muestras y se procesaron de la forma anteriormente descrita. A partir de las imágenes obtenidas en el microscopio se cuantificó la amplitud de la apertura estomática utilizando el programa Image J v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Para cada tratamiento se analizaron 5 hojas, de las cuales se observaron dos campos seleccionados al azar. Los datos fueron procesados y analizados estadísticamente de acuerdo al test de Student ($P < 0,05$).

3.12.2. Análisis de la anatomía foliar mediante microscopía óptica

Para analizar las diferentes estructuras histológicas de defensa, muestras de hojas de mandarina fueron fijadas en FAA (10% formaldehído, 5% ácido acético, 50% etanol y 35% agua) (D'Ambroggio de Argüeso, 1986). Las muestras (5x7 mm aproximadamente) se tomaron a ambos lados de la nervadura central en el punto de máximo ancho de la lámina foliar. A continuación, el material fue deshidratado en series crecientes de etanol: agua (60:40, 70:30, 80:20, 90:10 y 100:0) y etanol: xileno (75:25, 50:50, 25:75) hasta llegar al xileno absoluto, proceso que tomó 16 h. El parafinado se realizó embebiendo el material en mezclas de xileno: parafina durante 24 h a 65°C, en concentraciones crecientes de esta última (75:25, 50:50, 25:75), concluyendo con parafina pura durante 24 h más (Berlyn & Miksche, 1976). Las muestras parafinadas fueron cortadas en secciones de 10 μm de

espesor utilizando un micrótopo rotativo Reichert OmS (Reichert Optische Werke AG, Vienna, Austria) y depositadas en portaobjetos. Los tejidos fueron teñidos con los colorantes safranina-fast green y montados en bálsamo de Canadá de acuerdo a Strittmatter (1979) para la realización de preparados histológicos permanentes. El colorante safranina tiñe diferencialmente a la lignina (componente de la pared secundaria) y a la cutícula de color rosado, mientras que el colorante fast green tiñe a la celulosa (componente de la pared primaria y secundaria) de color verde claro o celeste. Finalmente, los preparados se observaron con microscopio óptico (Olympus BX50F4, Japón) para estudiar la disposición de los estomas, el grosor de la cutícula, la proporción de los diferentes tejidos, y su variación a medida que la hoja crece. El experimento fue repetido utilizando material de tres plantas diferentes para cada cultivar y estadio de crecimiento de la hoja. Estos experimentos se realizaron con la asistencia de la Prof. Alicia Amsler, del Laboratorio de Morfología Vegetal y Ambiente, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral.

3.12.3. Análisis de la anatomía foliar y cambios ultraestructurales inducidos por *X. citri* mediante microscopía electrónica de transmisión

Para observar la morfología de la epidermis de hojas de los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu' y los cambios ultraestructurales inducidos por la inoculación de la bacteria, se cortaron trozos de hojas de 2x3 mm a ambos lados de la nervadura central en el punto de máximo ancho de la lámina foliar. Las muestras se fijaron durante 24 h a 4°C en 4% (v/v) de glutaraldehído en buffer fosfato (1,8 g/l NaH₂PO₄; 23,25 g/l Na₂HPO₄.7H₂O; 5 g/l NaCl, en agua bidestilada, pH 7,4). Posteriormente, se lavaron con buffer fosfato, se colocaron en 2% (p/v) tetróxido de osmio, y se deshidrataron en series crecientes de acetona desde 25 hasta 100%. Las muestras se infiltraron en resina Spurr, se cortaron con ultramicrotomo (LKB, Bromma, Suiza) utilizando cuchilla de diamante, se contrastaron con 2% (p/v) acetato de uranilo durante 3 min y con 0,1% (p/v) citrato de plomo durante 1 min. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL

100CXII (JEOL, Japón) a 80 KV y las imágenes se digitalizaron con una cámara CCD Gatán, modelo ES1000W (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EE.UU).

Estos experimentos se realizaron con la asistencia del servicio de microscopía de la Unidad de Administración Territorial (UAT), dependiente del Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca (CCT-CONICET-BB). En las fotografías obtenidas se observaron las características de la epidermis, la estructura de los estomas y el grosor de la capa cuticular que los recubre. El espesor cuticular se midió en 3 sitios de la epidermis utilizando el programa Image J v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Se analizaron al menos 6 fotografías provenientes de 3 muestras diferentes por cada cultivar y los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el test t de Student ($P < 0,05$).

3.12.4. Cuantificación de ceras cuticulares

A fin de cuantificar las ceras cuticulares en hojas de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu', se utilizó el método descrito por Beattie & Marcell (2002) con algunas modificaciones. Las hojas de 4 brotes de cada cultivar (aproximadamente 20 hojas en total) se escanearon y se calculó el área foliar utilizando el programa Image J v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Posteriormente, las hojas de cada cultivar se colocaron separadamente durante 1 minuto en recipientes de peso conocido con cloroformo para extraer las ceras cuticulares. Los recipientes se dejaron bajo campana para evaporar el cloroformo y se pesaron 2 días después para asegurar la eliminación completa del solvente. La cantidad de ceras se expresó por unidad de área foliar, en función de los valores obtenidos previamente. Este procedimiento se repitió tres veces para cada cultivar y estado de desarrollo de las hojas. A los datos obtenidos se les aplicó el test t de Student ($P < 0,05$).

3.12.5. Medida de la permeabilidad cuticular

Para estudiar la permeabilidad cuticular en hojas de ambos cultivares de mandarina se usó el método descrito por Bessire *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Porciones del sector medio de hojas de mandarina se decoloraron en 95% etanol, se equilibraron en 0,2 M NaPO₄ (pH 9) por 1 h y se incubaron por diferentes tiempos en una solución 0,05% (p/v) de azul de toluidina en agua. Esta metodología supone que una mayor permeabilidad de la cutícula, permite una mayor penetración del colorante a los tejidos de la epidermis y mesófilo y por lo tanto, se observará una mayor coloración de la muestra. La permeabilidad de la cutícula fue analizada utilizando un capturador de imágenes (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System, BIO-RAD, EE.UU.). Se utilizaron como muestras de referencia diluciones del colorante y se cuantificó la permeabilidad con la ayuda del programa Quantity One (BIO-RAD, EE.UU.). El experimento se realizó por triplicado, utilizando 5 trozos de hojas provenientes de distintos brotes. A los datos obtenidos se les aplicó el test t de Student ($P < 0,05$).

3.13. Estudio de la expresión génica mediante microdissección de la epidermis abaxial

3.13.1. Preparación de bloques de parafina

En hojas seleccionadas de los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu' se cortaron trozos de 2x3 mm a ambos lados de la nervadura central, en el punto de máximo ancho de la lámina foliar. Los trozos de hojas se fijaron en methacarn (60% metanol, 30% cloroformo, 10% ácido acético) en un volumen al menos 10 veces superior al tamaño de la muestra durante 24 h a 4°C (Shibutani *et al.*, 2000). Otros fijadores que se probaron fueron FAA y etanol-ácido acético (3:1). El tejido fijado, independientemente de la solución de fijación utilizada, se traspasó a tubos de 15 ml y se deshidrató a temperatura ambiente de acuerdo a Kerk *et al.* (2003) con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se utilizó una serie gradual de etanol: agua (75:25, 85:15, 100:0, 100:0 y 100:0), seguida por

una serie de etanol: xileno (75:25, 50:50, 25:75, 0:100, 0:100, y 0:100) permaneciendo el tejido durante 1 h en cada solución. Al paso final se le agregó parafina en copos (Paraplast-X-Tra, Sigma) a temperatura ambiente hasta su fundición. Posteriormente, las muestras se llevaron a estufa a 54°C, y se agregó gradualmente parafina líquida a intervalos de 1 h hasta eliminar por completo al xileno. Las muestras en Paraplast-X-Tra fundida se posicionaron en moldes de manera de ser cortadas transversalmente. Los bloques de Paraplast-X-Tra se conservaron a 4°C hasta su utilización. En cada etapa del procesamiento de las muestras se extremaron los cuidados para evitar la acción de las enzimas ARNasas. Por consiguiente, se utilizó agua tratada con 0,1% (v/v) de dietilpicrocarbonato (DEPC) y material esterilizado en autoclave o estufa.

3.13.2. Aislamiento del ARN de los tejidos fijados

La integridad y cantidad del ARN total del tejido fue evaluada después de cada una de las etapas de fijación, deshidratación e imbibición en parafina (**Secciones 3.15 y 3.16**). Para ello, se tomaron al azar 6 trozos de hojas del tamaño de la tapa de un tubo eppendorf de 1,5 ml. Las porciones de hojas fijadas o deshidratadas se dejaron secar al aire, mientras que las embebidas en parafina se desparafinaron colocando las muestras durante 10 min en xileno. La extracción de ARN total fue realizada utilizando el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.13.3. Microdissección por captura laser

Los bloques de parafina se cortaron en secciones transversales seriadas de 10 µm con un micrótopo rotativo (Leica Microsystems, Alemania) y la integridad de los tejidos se analizó a través de microscopía (Olympus BX50F4, Japón). Las secciones se ubicaron sobre portaobjetos de aluminio con membrana de polietileno para microdissección (Leica Microsystems, Alemania), utilizando metanol para facilitar el montaje, y se dispusieron sobre una placa termostaticada a 50°C bajo campana hasta la evaporación completa del

metanol. Posteriormente, los tejidos se desparafinaron colocándolos dos veces en xileno durante 10 min y se dejaron secar bajo campana.

Para la microdissección de las células epidérmicas se utilizó un microdisector láser (Leica LMD6000, Leica Microsystems, Alemania), equipado con un cámara digital Hitachi. A partir de cada bloque de parafina se seccionaron aproximadamente 40.000 células epidérmicas, equivalentes a 8.000.000 de μm^2 de área de corte. Los parámetros de corte utilizados fueron: magnificación 20X, potencia 46, apertura 9, y velocidad 11. El tejido fue diseccionado inmediatamente después de haberse preparado y desparafinado y fue colectado automáticamente en microtubos de 0,5 ml con tapa adhesiva. La microdissección de cada portaobjeto no se extendió más allá de 45 min para evitar la degradación del ARN. Asimismo, la colección de las correspondientes células se realizó en diferentes microtubos para preservar la integridad del ARN. Finalizada la colección de las células, se procedió a aislar ARN. Para ello, se le adicionó a la tapa de cada microtubo aproximadamente un tercio de la cantidad de buffer de extracción especificada por el proveedor del kit Arcturus PicoPure RNA Isolation (Applied Biosystems, EE.UU.). Los microtubos se mantuvieron a 42°C durante 30 min, luego se centrifugaron a 800 rpm durante 2 min para colectar las células en la porción inferior del tubo y se los conservó a -80°C hasta su procesamiento final (Kerk *et al.*, 2003). Para ello, se unieron las células microdisseccionadas de 3 microtubos y se siguió el protocolo propuesto por el proveedor del kit de extracción de RNA antes mencionado. Se procesaron al menos tres réplicas diferentes para cada tratamiento, provenientes de distintos bloques de parafina. En cada etapa del procesamiento de las muestras y de la microdissección se extremaron los cuidados para evitar la acción de las enzimas ARNasas. Se utilizaron guantes de latex, los elementos usados se limpiaron con alcohol y posteriormente con RNaseZap (Ambion, EE.UU.). Los portaobjetos, microtubos y platina del microdisector fueron sometidos a radiación UV en un crosslinker a máxima potencia durante 30 min para la eliminación de ARNasas. La cantidad e integridad del ARN obtenido se analizó por electroforesis capilar (**Sección 3.16**).

Los trabajos de microdissección se realizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia, bajo la dirección del Dr. José Gadea; y en el Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, Italia, bajo la dirección de la Dra. Colombo.

3.14. Estudio de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

3.14.1 Aislamiento y purificación de ARN para qRT-PCR

Para la purificación de ARN de tejido total, seis hojas de cada cultivar de mandarino (aproximadamente 5 g) se trituraron en N₂ líquido, se agregaron 15 ml de tampón de extracción (200 mM Tris HCl pH 8,5; 200 mM Sacarosa; 30 mM Acetato de magnesio; 60 mM KCl; 0,5% (p/v) PVP; 0,5% Deoxicolato de sodio; 1% SDS; 1% N-lauril sarcosina; 10 mM EDTA) y 350 µl de β- mercaptoetanol, éste último fue agregado inmediatamente antes de su uso. Luego de una agitación vigorosa, el homogenizado se trasvasó a un tubo falcon de 50 ml y se agregó 15 ml de fenol-Tris HCl pH 8. Después de la centrifugación (10.000 rpm a 4°C durante 15 min), la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 15 ml de una solución fenol: cloroformo (1:1). La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 15 min y la fase acuosa se recolectó para un nuevo tratamiento con 15 ml de cloroformo, el cual fue centrifugado nuevamente en las mismas condiciones antes mencionadas. Los ácidos nucleicos totales fueron precipitados con 1/10 v de 3 M Acetato de sodio pH 4,8 y 2,5 v de etanol absoluto y colectados por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. El pellet fue lavado y disuelto en 10 ml de H₂O destilada estéril tratada con DEPC. A continuación, se realizó una precipitación diferencial de polisacáridos contaminantes mediante el agregado de Acetato de amonio pH 5,2 hasta una concentración final de 0,1 M (aproximadamente 2 ml) y etanol absoluto a una concentración final de 10% (1,2 ml). La muestra fue agitada suavemente, incubada en hielo durante 10 min y centrifugada a 10.000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante (~ 10 ml) fue transferido a un tubo falcon de 15 ml estéril. Se adicionó LiCl al sobrenadante a

una concentración final de 2 M para precipitar selectivamente los ARN de alto peso molecular y se incubó toda la noche a 4°C. El sedimento fue centrifugado a 10.000 rpm a 4°C durante 30 a 45 min, lavado con 70% etanol absoluto, secado a 37°C durante 5 min y resuspendido en 50 µl de agua estéril tratada con DEPC. Los ARNs purificados, cuyo rendimiento fue de aproximadamente 5 µg/µl, se conservaron a -80°C.

3.14.2. Tratamiento del ARN total con ADNasaI

Los ARNs totales fueron tratados con ADNasaI libre de ARNasa, para lo cual se utilizó RQ1 (Promega, Alemania) según el siguiente protocolo:

ARN	4 µg
Buffer DNaseI	2 µl
RQ1 (Promega)	1 µl
H ₂ O cantidad suficiente para (c.s.p.)	20 µl

La mezcla se incubó 30 min a 37°C. A continuación para inactivar la enzima se agregó 1 µl de DNase Stop Solution (Promega, Alemania) y se incubó 10 min a 65°C.

3.14.3. Síntesis de ADNc a partir del ARN tratado con ADNasaI

Para llevar a cabo los experimentos de qRT-PCR se utilizaron muestras de ARN total de alta pureza obtenidas como se describió en las **Secciones 3.14.1 y 3.14.2**. Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se siguió el siguiente protocolo:

ARN (~1 µg/µl)	5 µl
dNTPs 25 mM	0,4µl
Oligo dT 0,5µg/µl	1 µl
H ₂ O c.s.p.	14 µl

La mezcla de reacción se incubó a 65°C durante 5 min. A continuación se incubó en hielo durante 1 min y se agregaron los reactivos restantes:

5X First-Strand Buffer	4 µl
DTT 0,1 M	1 µl
RiboLock (Fermentas)	0,5 µl
M-MLV RT (Invitrogen)	0,5 µl

La mezcla de reacción se incubó a 38°C durante 50 min y se agregó otro paso de incubación a 70°C durante 15 min para inactivar a la enzima.

dNTPs 25 mM: mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración de 25 mM cada uno.

RiboLock: Inhibidor de ARNasa A, B y C para impedir la degradación del molde de ARN (Fermentas, Canadá).

DTT (Ditiotreitol): Agente reductor (Invitrogen, EE.UU.).

5x First-Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂ (Invitrogen, EE.UU.).

M-MLV RT (del inglés, *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*): Transcriptasa reversa, 200 U/µl (Invitrogen, EE.UU.).

3.14.4. Cebadores y condiciones térmicas para qRT-PCR

Para el diseño de cebadores se utilizó la secuencia genómica del mandarino *Citrus clementina*, disponible en el sitio Phytozome (www.phytozome.net; Goodstein *et al.*, 2012). A partir de la secuencia proteica del gen de interés en *Arabidopsis*, se buscó la secuencia en

el genoma de *C. clementina* que presentaba mayor identidad. Sobre ésta, se diseñaron los cebadores utilizando el Programa Primer 3 v 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>; Untergrasser *et al.*, 2012). Los cebadores utilizados en este estudio están detallados en la

Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Cebadores y condiciones térmicas de qRT-PCR. Las reacciones de qPCR fueron iniciadas con un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 94°C. Cada uno de los 40 ciclos de amplificación incluyó una desnaturalización de 15 seg a 94°C y una elongación de 45 seg a 72°C. Al finalizar la reacción se llevó a cabo una curva de fusión para evaluar la especificidad del producto amplificado.

Gen	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Temperatura y tiempo de hibridación	Tamaño de producto	Referencia
HISTONA H4	H4f	AGGCAAGGGATTGGGAAAGG	57°C 30 seg	268 pb	Shiotani <i>et al.</i> (2007)
	H4r	AGAGCGTAAACGACGTCCATC			
CER1	CER1f	CCACAGTTTCCACCAAATGA	57°C 30 seg	196 pb	Este trabajo
	CER1r	CGTAACCACATTTCGTGTTCCG			
CER3	CER3f	CAAGCAGCTCAACATTCCAA	60°C 30 seg	171 pb	Matas <i>et al.</i> (2010)
	CER3r	ATTGTCAGGCAATCTCATGG			
CER4	CER4f	GCTTCCTTGGAGACGTGAAG	57°C 30 seg	181 pb	Este trabajo
	CER4r	CGGTAGGCGTAATCCTGAAG			
CER6	CER6f	AGCTCGTAATCTTCTCCGCC	57°C 30 seg	186 pb	Este trabajo
	CER6r	TGCAGCCCATACCCGAAAG			
CER7	CER7f	TAGGAGGCCTGAATGCTCAC	60°C 30 seg	174 pb	Este trabajo
	CER7r	GCTTCTTCGTGGTGAGTTGG			
MAH1	MAH1f	TACGCTGCCACACCTTCTTC	57°C 30 seg	198 pb	Este trabajo
	MAH1r	TTGAACTCTGGCCCTTTCGG			
WSDL	WSDLf	AAGGTGGACCAGGAGTTGAG	-----	153 pb	Este trabajo
	WSDLr	ATGCAGATACCGCGAGAGAG			
LACS1	LACS1f	CTGTCTTTCCTGCCTCTTGC	57°C 30 seg	145 pb	Este trabajo
	LACS1r	CCGCTAGAAGTGTTGGCTTC			
LACS2	LACS2f	GGTGCAATCCTGGAGATCG	57°C 30 seg	140 pb	Este trabajo
	LACS2r	ATGAACTCCACCGCATTAGC			
CYP86A	CYP86Af	TATCTGTGCAATCCCCTTCC	57°C 30 seg	154 pb	Este trabajo
	CYP86Ar	GCCTTCACCAAGCAGATCAT			
GPAT4	GPAT4f	ACGATGGCCGTCTAGTTCAG	57°C 30 seg	200 pb	Este trabajo

	GPAT4r	CCCACTAGATGGAGCAGGAG			
GDSL	GDSLf	GTATGGATTGGGAGCAAGGA	57°C 30 seg	240 pb	Matas <i>et al.</i> (2010)
	GDSLr	GGGGACTGGACAAGTTCAAA			
MYB30	MYB30f	ACCTAAGGCCAGGGATCAAG	-----	183 pb	Este trabajo
	MYB30r	GTTGCAGCTTCCTCACCTTC			
WIN1	WIN1f	GTCATCACCAACGGAGAAGG	57°C 30 seg	124 pb	Este trabajo
	WIN1r	TGAGGGATGGAGATGGAGAC			
ABC	ABCf	CCAAAGCTTAAGGGTGAGGA	57°C 30 seg	179 pb	Matas <i>et al.</i> (2010)
	ABCr	CTTCTGGCGAAAACCTCTGTG			

CER1, eceriferum 1; *CER3*, eceriferum 3; *CER4*, acil-CoA reductasa; *CER6*, β -cetoacil-CoA sintasa KCS6/ eceriferum 6; *CER7*, factor de transcripción ribonucleasa 7; *MAH1*, hidroxilasa de alcanos MAH1; *WSDL*, sintasa de ceras; *LACS1* y *LACS2* sintetasa de ácidos grasos de cadena larga 1 y 2, respectivamente; *CYP86A*, oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450 de la subfamilia CYP86A2/ATT1; *GPAT4*, glicerol-3-fosfato acil-CoA aciltransferasa 4; *GDSL*, lipasa de la familia GDSL; *MYB30*, factor de transcripción MYB30; *WIN1*, factor de transcripción inductor de ceras 1; *ABC*, transportador ABC dependiente de ATP.

3.14.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando Mezcla Real® en presencia de Eva green (Biodynamics, Argentina) y fueron monitoreadas por PCR en tiempo real en un termociclador Mastercycler® ep *realplex* (Eppendorf, Alemania). Las reacciones se llevaron a cabo según el siguiente protocolo:

ADNc (dilución 1/10)	5 μ l
Mezcla Real 2X	10 μ l
Mezcla de cebadores 5 μ M	1-4 μ l
H ₂ O c.s.p.	20 μ l

Para las cuantificaciones se utilizó como control interno un amplicon de 268 pb, correspondiente a la *HISTONA H4* de *Citrus jambhiri* (GenBank: AB050889) que fue

amplificada usando los cebadores H4f/H4r (**Tabla 3.3**; Shiotani *et al.*, 2007). En cada caso, se analizaron las curvas de temperatura de fusión (T_m) con el propósito de descartar amplificaciones no específicas. La expresión relativa de los transcritos de ARN fue calculada usando los valores del ciclo umbral (C_t , del inglés *Cycle threshold*) obtenidos para cada muestra con la siguiente ecuación: expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, siendo $\Delta\Delta C_t = (C_t_{\text{gen blanco 'Okitsu'}} - C_t_{\text{gen blanco 'Clemenules'}}) - (C_t_{\text{histona H4 'Okitsu'}} - C_t_{\text{histona H4 'Clemenules'}})$ (Livak y Schmittgen, 2001). Las muestras provenientes de hojas de 'Clemenules' se utilizaron como muestras de referencia. Los resultados fueron normalizados contra la expresión del gen endógeno *HISTONA H4*. Los valores promedios fueron calculados de experimentos realizados por duplicado.

3.15. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración de los ácidos nucleicos fue determinada espectrofotométricamente (Sambrook *et al.*, 1989). Para determinar la concentración de ARNs se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Amersham). La relación de las lecturas a 260/280 debe ser alrededor de 2 para muestras de ARN. Una absorbancia de 1 a 260 nm y con un camino óptico de 1 cm, corresponde a 40 $\mu\text{g/mL}$ para ARN.

3.16. Electroforesis de ARN en geles de agarosa

La separación de las moléculas de ARN se realizó por electroforesis en geles de agarosa utilizando el sistema tipo submarino (Sambrook *et al.*, 1989). Los geles se prepararon en solución tampón 1x TAE conteniendo 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de bromuro de etidio. La concentración de agarosa utilizada fue de 0,8% (p/v). Las muestras se sembraron utilizando solución de siembra en una proporción 6:1 (muestra de ARN: solución de siembra). Las corridas electroforéticas se realizaron entre 60 a 100 mA en solución tampón 1x TAE. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron observadas bajo luz UV (300

nm). Las imágenes fueron digitalizadas utilizando un capturador de imágenes (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System, BIO-RAD, EE.UU.) y el programa Quantity one (BIO-RAD, EE.UU.).

Composición de las soluciones:

<u>Solución tampón 1x TAE (pH 8,0)</u>		<u>Solución de Siembra</u>	
Tris-Acetato	40 mM	Azul de bromofenol	0,25%
EDTA	1 mM	Xileno-cianol	0,25%
		Glicerol en H ₂ O	30%

Por otro lado, la integridad y cantidad de ARN de las muestras microdisecionadas y de las obtenidas luego de cada uno de los pasos intermedios de fijación, deshidratación e imbibición en parafina (**Secciones 3.13.2 y 3.13.3**) se analizó por electroforesis capilar en un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc., EE.UU.), utilizando el kit RNA 6.000 Pico LabChip (Agilent, EE.UU.).

4. Resultados y Discusión

Capítulo I

**Análisis de la interacción entre *X. citri* y los
cultivares de mandarino 'Clemenules' y 'Okitsu'
a campo y bajo condiciones controladas**

4.I.1. Resumen

El Censo Nacional Agropecuario (2002) registró sólo 504 ha de frutales cítricos en la provincia de Santa Fe, principalmente naranjas (78%) y mandarinas (19%). La zona central de la provincia de Santa Fe presenta condiciones agroecológicas adecuadas para la producción de cítricos, aunque para extender la producción de estos frutales, es necesaria la difusión de los conocimientos de adaptación de los diferentes cultivares, así como la información referente al comportamiento frente a las enfermedades más importantes de los cítricos. En relación a este punto, la cancrrosis de los cítricos es una de las enfermedades que mayores daños causa en las plantaciones de la provincia.

Entre todas las medidas de manejo aplicables a la cancrrosis bacteriana de los cítricos, el cultivo de genotipos resistentes es la mejor solución a largo plazo (do Amaral *et al.*, 2010; Vilorio *et al.*, 2004). Afortunadamente, existen diferencias de susceptibilidad entre las especies y cultivares del género *Citrus* (Gottwald *et al.*, 2002). Específicamente, entre los genotipos de mandarino ha sido reportado que el cv. 'Okitsu' es más resistente al desarrollo del cancro que el cv. 'Clemenules', (do Amaral *et al.*, 2010; Gottwald *et al.*, 2002; Shiotani *et al.*, 2008; Shiotani *et al.*, 2009), aunque los mecanismos involucrados en esta resistencia diferencial son desconocidos. En la zona centro-este de la provincia de Santa Fe también se han notado a campo grandes diferencias en susceptibilidad a cancrrosis entre estos cultivares, que de acuerdo a su producción y calidad de frutas resultaron ser los más adaptados a la región, entre varios genotipos de mandarino evaluados (Micheloud, 2013).

En el presente Capítulo se describen los resultados obtenidos en el análisis de la interacción entre *X. citri* y estos dos cultivares de mandarino tanto a campo como en cámara de crecimiento. Para ello se plantearon los siguientes objetivos: i) Realizar mediciones a campo de Incidencia y Severidad en los cultivares de mandarino 'Clemenules' y 'Okitsu' para caracterizar las diferencias de comportamiento a cancrrosis; ii) Realizar pruebas de patogenicidad en hojas de distinta edad de ambos cultivares de mandarino, en condiciones controladas y por diferentes métodos de inoculación, para

determinar cuál de éstos reproduce mejor las diferencias de comportamiento a la enfermedad observadas a campo; iii) Analizar la adherencia y formación de biofilm de *X. citri* en hojas de los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu'; iv) Caracterizar la interacción de ambos cultivares con otro genotipo de *Xanthomonas* formadoras de cancro/HR en cítricos.

4.I.2. Resultados

4.I.2.1. Las evaluaciones a campo demuestran que las hojas de 'Okitsu' presentan un menor período de susceptibilidad a *X. citri*

En los cítricos, el período de máxima susceptibilidad a *X. citri* ocurre entre los estados fenológicos BBCH 15 y BBCH 19 correspondientes a un 50 y 100% de expansión de las hojas (Agustí *et al.*, 1997, Gottwald *et al.*, 2002). Estos estados fenológicos se monitorearon en plantas de los cv. 'Okitsu' y 'Clemenules' a campo, entre septiembre y noviembre de los años 2009 y 2010, en ramas seleccionadas durante la brotación primaveral (**Figura 4.I.1 A**). Notablemente, la duración del período transcurrido entre BBCH 15 y BBCH 19 en los brotes de 'Clemenules' fue de 16 (en 2009) y 10 (en 2010) días más largo en comparación con lo observado en los brotes de 'Okitsu' (**Figura 4.I.1 B**).

A fin de relacionar estos datos fenológicos con la susceptibilidad a la infección por *X. citri* a campo, en diciembre de cada año se efectuaron mediciones de cancrrosis en las ramas seleccionadas (**Figura 4.I.1 A**). En el verano de 2009, la incidencia promedio de cancrrosis en hojas de 'Clemenules' fue 10 veces mayor en comparación con la del cv. 'Okitsu'. La misma tendencia se observó en el 2010, alcanzando registros de 11 veces superiores en el cv. 'Clemenules' (**Figura 4.I.1 C**). Es de destacar, que durante este año la incidencia de la enfermedad en ambos cultivares fue menor que la del año anterior. Estos resultados se correlacionan con una drástica reducción de las lluvias caídas durante la primavera y comienzos de verano, en comparación con el promedio del área central de la provincia de Santa Fe y con las precipitaciones ocurridas en el año 2009 (**Tabla 4.I.1**).

La severidad promedio fue la variable más apropiada para mostrar las diferencias entre cultivares, siendo 26,6 y 18 veces superior en 'Clemenules' que en 'Okitsu' durante los años 2009 y 2010, respectivamente. Por otro lado, la severidad máxima fue 4,7 y 2,8 veces superior en 'Clemenules' durante el mismo período de tiempo (**Figura 4.I.1 B**). Estos resultados confirman que los brotes de 'Okitsu' son más resistentes a la infección por *X. citri* a campo. Por otra parte, los resultados presentados sugieren que la menor duración

del período de susceptibilidad a la infección por *X. citri* en los brotes de este cultivar podría ser uno de los factores que contribuye a la mayor resistencia al cancro bacteriano bajo condiciones de campo.

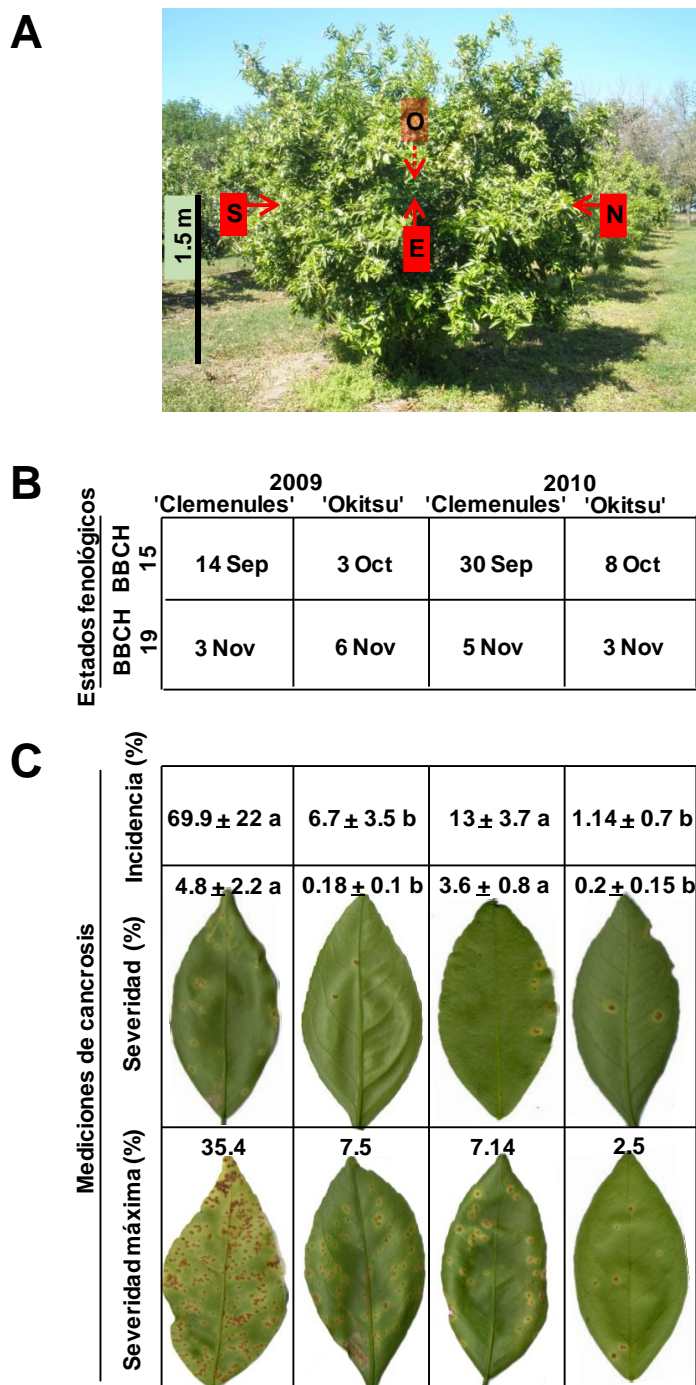


Figura 4.I.1. Mediciones a campo de la fenología de dos cultivares de mandarina, e incidencia y severidad de la cancrrosis bacteriana. A- Durante la primavera de los años 2009 y 2010 se

seleccionaron cuatro ramas jóvenes y sanas a 1,5 m de altura distribuidas en los cuatro cuadrantes de la copa de los árboles. **B-** Estados fenológicos registrados en brotes primaverales de las ramas seleccionadas, de acuerdo a la escala Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry (BBCH) para cítricos. **C-** Incidencia y severidad de cancrrosis. La incidencia se calculó como la proporción de las hojas sintomáticas sobre el total de hojas examinadas en diciembre de cada año. La severidad se evaluó en el mismo momento en las 5 hojas más afectadas de las ramas. Los síntomas se registraron mediante fotografías digitales y las fotos presentadas son representativas del promedio encontrado para cada parámetro. Los valores están expresados como la media \pm el desvío estándar. Medias seguidas por diferentes letras en la misma línea y año de evaluación difieren significativamente (Test t de Student, $P < 0,05$). Se usó un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones por cultivar.

Tabla 4.I.1: Temperatura media mensual y precipitaciones históricas en comparación con las registradas durante la primavera y comienzos de verano de los años 2009 y 2010 en la región central de la provincia de Santa Fe. Los datos climáticos históricos son el promedio de 30 años de registros, obtenidos de la Estación Meteorológica del Aeropuerto Sauce Viejo (31°7' S; 60°81' W; 17 msnm), Santa Fe, Argentina. Los datos de los años 2009 y 2010 fueron obtenidos de la Estación Meteorológica automática de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral.

Meses	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Promedio Histórico Zonal				
Temperatura media (°C)	16	19,5	21,9	24,9
Precipitaciones (mm)	45,1	103,6	125,7	132,5
Año 2009				
Temperatura media (°C)	14,4	20,2	24,4	23,7
Precipitaciones (mm)	88	87	191	287
Año 2010				
Temperatura media (°C)	16	19	23,3	25,7
Precipitaciones (mm)	34	30	47	99

4.I.2.2. La resistencia a cancrrosis se “quiebra” cuando las hojas de 'Okitsu' son inoculadas con *X. citri* por el método de infiltración

Con el objetivo de determinar si el método de inoculación posee efecto sobre la susceptibilidad diferencial a cancrrosis entre ambos cultivares de mandarina, se realizaron ensayos de patogenicidad en cámara de crecimiento. Para estos estudios se seleccionaron brotes nuevos de aproximadamente 1 cm de tamaño y con al menos 5 hojas. Se consideró que las hojas del mismo brote poseían la misma edad ontológica. Cada hoja del brote

seleccionado, comenzando por la más alejada del ápice, fue inoculada con *X. citri* a los 15, 18, 22, 25 y 27 días de edad, respectivamente (Stall *et al.*, 1982) (**Figura 4.I.2**).

La suspensión bacteriana fue inoculada por dos métodos contrastantes: infiltración (10^3 ufc/ml) y aspersión (10^7 ufc/ml). Mediante la infiltración se introduce el inóculo bacteriano directamente en el mesófilo de las hojas traspasando todas las barreras superficiales de las hojas, lo cual en el campo ocurre cuando el ingreso se da a través de heridas; mientras que mediante la aspersión se pulveriza el inóculo sobre la cara abaxial de las hojas, simulando el efecto de la dispersión por lluvias e ingreso por estomas que ocurre en la naturaleza (Rigano *et al.*, 2007).

Los síntomas de la enfermedad se cuantificaron a los 30 días post-inoculación (dpi). La severidad, medida como el número de canchros por unidad de área, no presentó diferencias significativas entre los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu' luego de la inoculación de *X. citri* vía infiltración (**Figura 4.I.2 A**). En ambos cultivares el número máximo de lesiones se observó en las hojas inoculadas por el método de infiltración a los 15 días (13 lesiones/cm² en promedio), decreciendo con la edad de la hoja hasta aproximadamente 6 lesiones/cm² en hojas inoculadas a los 27 días de edad (**Figura 4.I.2 A**). Por otro lado, cuando la bacteria fue inoculada vía aspersión, se observó una reducción en la severidad de canchrosis en ambos cultivares. Notablemente, la reducción en el número de canchros fue significativamente mayor en el cv. 'Okitsu' que en 'Clemenules' en todos los estados de desarrollo analizados, excepto en hojas inoculadas a los 27 días de edad. Por lo tanto, las máximas diferencias entre cultivares se encontraron en hojas inoculadas en el período comprendido entre los 15 y 22 días de edad, y decrecieron a medida que las hojas se desarrollaron (**Figura 4.I.2 B**).

Para cuantificar el crecimiento bacteriano en el período de máxima susceptibilidad del brote de ambos cultivares de mandarino, es decir, brotes de 18 días de edad, se inocularon hojas de ambos cultivares con suspensiones bacterianas de *X. citri*. Cuando el inóculo fue infiltrado (10^3 ufc/ml) en el tejido del mesófilo, *X. citri* aumentó su población gradualmente en ambos cultivares después del primer día post-inoculación

incrementándose en 5 órdenes de magnitud al final de las 2 semanas de monitoreo (**Figura 4.I.3 A**). Estos resultados concuerdan con los síntomas mostrados en las fotografías de las hojas de ambos cultivares a los 20 dpi (**Figura 4.I.3 A**). Sin embargo, cuando las hojas fueron inoculadas por aspersión (10^7 ufc/ml), se encontraron diferencias sustanciales en el patrón de crecimiento bacteriano entre ambos cultivares. La población de *X. citri* en 'Clemenules' se multiplicó constantemente por más de 3 órdenes de magnitud a lo largo del período de monitoreo. Por el contrario, en 'Okitsu' la población bacteriana decreció constantemente luego del tercer día post-inoculación, y no se recuperaron bacterias luego de 15 dpi (**Figura 4.I.3 B**). Los síntomas de cancrrosis a los 20 dpi se manifestaron claramente en 'Clemenules', mientras que en 'Okitsu' se desarrollaron menos de tres lesiones, tal como se muestra en las fotografías de las hojas de la **Figura 4.I.3 B**.

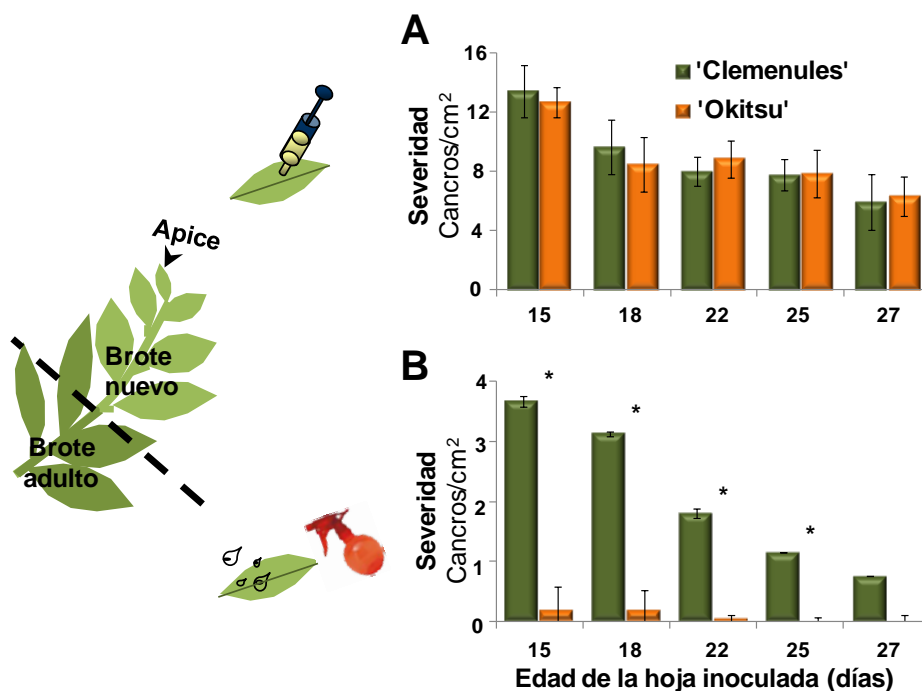


Figura 4.I.2. Análisis de patogenicidad de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) en hojas de mandarinos, cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu' bajo condiciones controladas. Se seleccionaron brotes nuevos de aproximadamente 1 cm de tamaño y con al menos 5 hojas. Cada hoja del brote seleccionado, comenzando por la más alejada del ápice, fue inoculada con *X. citri* a los 15, 18, 22, 25 y 27 días de edad, respectivamente. Las suspensiones bacterianas se prepararon en una solución de 10 mM MgCl₂ y se inocularon en las hojas usando dos métodos de inoculación: **A-** Infiltración (10^3 ufc/ml) y **B-** Aspersión (10^7 ufc/ml), respectivamente. Los valores están expresados como la media \pm la desviación estándar. Los datos marcados con asterisco difieren significativamente entre ambos

cultivares de acuerdo al test t de Student, $P < 0,05$. Todas las inoculaciones involucraron como mínimo dos brotes por cada planta, y cuatro plantas para cada cultivar y método de inoculación. El progreso de la enfermedad se monitoreó fenotípicamente en tres ensayos biológicos separados y se cuantificaron los canchros/cm² 30 días post-inoculación (dpi), usando el programa Image J software v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Estos resultados sugieren que las barreras constitutivas de la superficie de la hoja del cv. 'Okitsu' protegen a la planta de la infección por *X. citri*. Como fue mostrado en la **Figura 4.I.2**, las diferencias en comportamiento entre cultivares son máximas cuando las hojas son inoculadas por aspersión y preferentemente en estadios tempranos del desarrollo de la hoja, sugiriendo que estas barreras se forman más rápido en el cultivar 'Okitsu'. En concordancia, el desarrollo fenológico a campo en este cultivar es más rápido que el de 'Clemenules', como fue previamente demostrado (**Figura 4.I.1**).

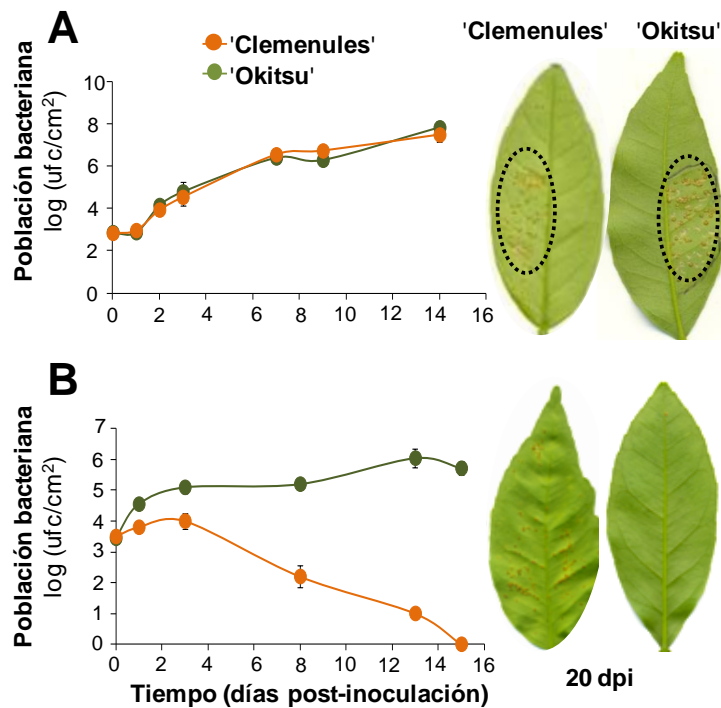


Figura 4.I.3. Crecimiento de la población bacteriana en cultivares de mandarina durante el período de máxima susceptibilidad a canchrosis. Crecimiento *in planta* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) en hojas de 18 días de edad y desarrollo de síntomas inducido por la bacteria inoculada por: **A-** Infiltración (10³ ufc/ml), y **B-** Aspersión (10⁷ ufc/ml). Los valores están expresados como la media ± el desvío estándar de tres replicados biológicos independientes, cada uno obtenido a partir de tres medidas separadas de la población bacteriana en cada cultivar. Las líneas negras punteadas muestran el área de la hoja infiltrada.

4.I.2.3. *X. citri* no es capaz de formar una estructura de biofilm sobre la superficie de las hojas de 'Okitsu' durante el período de máxima susceptibilidad

El ingreso del patógeno al tejido vegetal es un paso crítico para desencadenar la infección. Ha sido demostrado que *X. citri* crece en forma epifítica sobre la superficie de las hojas hasta que se den las condiciones óptimas para poder ingresar al espacio intercelular a través de los estomas y colonizar el tejido (Rigano *et al.*, 2007). Este crecimiento está acompañado por la formación de biofilms, que es el primer paso en el desarrollo del cancro.

Para que un biofilm se desarrolle se requiere de la adhesión de las células a un sustrato biótico, y de la comunicación entre las bacterias, lo cual permite el inicio de la formación de pequeñas microcolonias (Branda *et al.*, 2005; Parsek & Fuqua, 2004; Vojnov & Marano, 2014). El desarrollo de estas biopelículas requieren de una serie de pasos altamente regulados, donde influyen factores físicos, ambientales y biológicos (Camilli & Bassler, 2006).

Los análisis de patogenicidad comparando diferentes métodos de inoculación, sugieren que las características o propiedades de la superficie de la hoja de 'Okitsu' son responsables de la mayor resistencia a *X. citri*. En base a estas consideraciones, se realizaron estudios de adherencia, crecimiento epifítico y formación de biofilm de *X. citri* sobre la superficie de las hojas de ambos cultivares.

Para evaluar la capacidad de adhesión de las bacterias a la superficie foliar de 'Clemenules' y 'Okitsu', se incubaron a 28°C discos de hojas de 18 días de desarrollo con *X. citri* (10^7 ufc/ml), de acuerdo a Rigano *et al.* (2007). Después de 1, 5 y 24 h de incubación, las bacterias adheridas fueron reveladas por tinción con cristal violeta. En este estudio se pudo observar que al comienzo de la interacción planta-patógeno (1 y 5 h) no hay diferencias entre ambos cultivares. Sin embargo, la adherencia de *X. citri* se incrementó significativamente en 'Clemenules' luego de 24 h de incubación (**Figura 4.I.4 A**), particularmente en los sitios de unión entre las células epidérmicas y alrededor de las

células oclusivas de los estomas, los cuales representan la principal vía de ingreso de *X. citri*.

Por otro lado, se investigó la habilidad de *X. citri* de desarrollar biofilms en la superficie de las hojas. Para ello, se inocularon por aspersión con la cepa de *X. citri* transformada con GFP (*X. citri*-GFP, 10^3 ufc/ml) hojas de 18 días de edad de ambos cultivares y se monitoreó el crecimiento bacteriano durante 10 días utilizando microscopía de fluorescencia y confocal. A tiempos tempranos post-inoculación (3 dpi) la colonización bacteriana fue semejante en ambos cultivares, y sólo se observaron microcolonias bacterianas en sitios protegidos alrededor de los estomas y en las uniones entre las células epidérmicas (datos no mostrados). Sin embargo, la población epifítica de *X. citri*-GFP en 'Clemenules' se incrementó marcadamente a los 5 dpi y durante todo el período de seguimiento (**Figura 4.I.4 B**). A los 7 dpi, las uniones entre las células epidérmicas y los estomas fueron colonizados totalmente por agregados de la bacteria en este cultivar. Para confirmar si *X. citri*-GFP estaba conformando una estructura de biofilm en 'Clemenules', se observaron muestras a los 7 dpi utilizando microscopía confocal, con el fin de realizar proyecciones tridimensionales. En las hojas de 'Clemenules' las proyecciones de los ejes ZX mostraron la formación de microcolonias compactas con una estructura tridimensional similar a biofilm (**Figura 4.I.4 C**). Por el contrario, la población epifítica de *X. citri*-GFP permaneció estable en 'Okitsu', y no se observaron microcolonias o estructuras complejas luego de 7 dpi (**Figura 4.4.I. B y C**).

En su conjunto, estos resultados sugieren que las diferencias en las propiedades de la superficie de las hojas entre ambos cultivares de mandarina influyen en el crecimiento epifítico, la adherencia y la formación de biofilm de *X. citri* en cada cultivar. Específicamente, la superficie de las hojas de 'Okitsu' parece interferir con factores bacterianos que son claves para la colonización de *X. citri* y el posterior establecimiento de la enfermedad, cumpliendo una función de barrera de defensa primaria frente al patógeno.

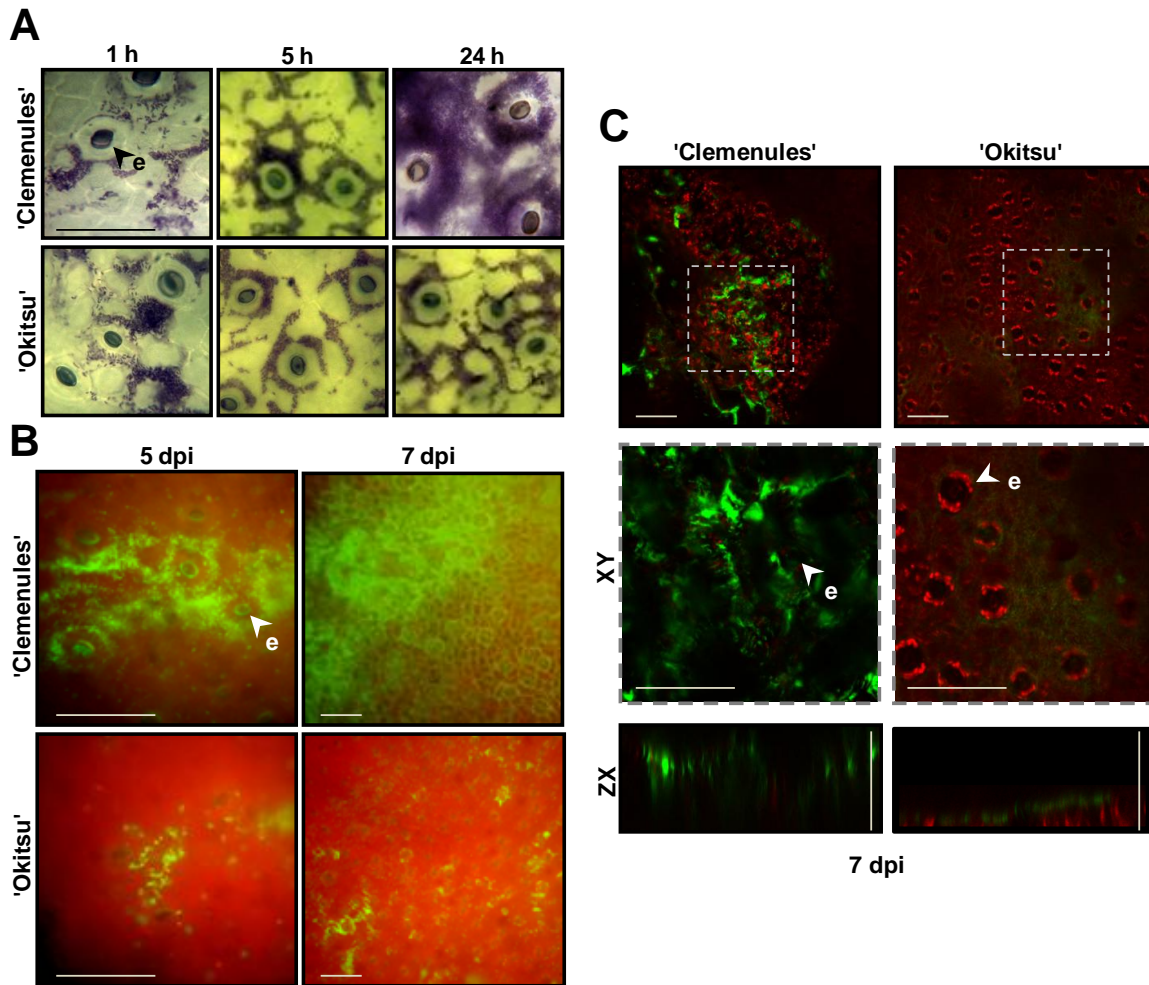


Figura 4.I.4. La superficie de las hojas de 'Okitsu' influencia el crecimiento epifítico y la formación de biofilm de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). A- Adherencia de *X. citri* a la superficie abaxial de hojas de 18 días de edad evidenciada por la tinción bacteriana con cristal violeta luego de 1, 5 y 24 h de incubación. Las células adheridas a la superficie de la hoja fueron observadas bajo microscopio óptico. B- Crecimiento epifítico de *X. citri*-GFP en hojas de 18 días de edad asperjadas con la bacteria y monitoreadas con microscopio de fluorescencia. C- Formación de biofilm de *X. citri*-GFP en hojas de 18 días de edad asperjadas con la bacteria y monitoreadas con microscopía confocal. Las secciones de los paneles superiores se muestran magnificadas en los paneles inferiores. El rojo indica autofluorescencia de la clorofila y el verde, bacteria transformada con GFP. XY y ZX son proyecciones de los ejes XY y ZX, respectivamente. La proyección del eje ZX muestra el desarrollo de los biofilms en altura. Barras: 50 μm. e: estoma; dpi: días post-inoculación. Los experimentos fueron repetidos en al menos tres plantas diferentes y se examinaron tres hojas por planta.

4.I.2.4. Las barreras de defensa primarias de 'Okitsu' también protegen a la planta del ingreso de la cepa avirulenta *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C

La bacteria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (*X. aurantifolii* C) desencadena una HR asociada a la muerte celular del tejido inoculado en hojas de todas las especies de cítricos, excepto en *Citrus aurantifolia* (Chiesa *et al.*, 2013). Esta respuesta de defensa está asociada con la percepción y reconocimiento del patógeno a través de su interacción con las células del mesófilo (Cernadas *et al.*, 2008).

Para profundizar cuál es el rol de las barreras superficiales de las hojas de los cultivares estudiados en la defensa a otro genotipo de *Xanthomonas* formadora de cancro/HR en cítricos, se inocularon por aspersión e infiltración hojas de 18 días de edad con suspensiones de la cepa de *X. aurantifolii* C transformada con GFP (*X. aurantifolii* C-GFP). Siete días luego de la infiltración, se visualizó una típica HR en ambos cultivares, que se manifestó claramente por la necrosis de la zona infiltrada y por la ausencia de la fluorescencia verde de la bacteria transformada con GFP (**Figura 4.I.5A**). Por otro lado, la aspersión de *X. aurantifolii* C-GFP produjo lesiones aisladas tipo HR en toda la superficie de la hoja de 'Clemenules' luego de 15 dpi, mientras que no se detectaron lesiones durante todo el período de seguimiento en 'Okitsu' (**Figura 4.I.5B**). En paralelo, se realizó un experimento control con la cepa de *X. citri* transformada con GFP (*X. citri*-GFP). Pasados 7 días de la inoculación, en ambos cultivares se observó una extendida fluorescencia verde en el área infiltrada de ambos cultivares (**Figura 4.I.5A**). Sin embargo, luego de 15 días de la aspersión, el desarrollo de los síntomas de cancrrosis y la fluorescencia verde de *X. citri*-GFP sólo fueron observados en las hojas inoculadas de 'Clemenules' (**Figura 4.I.5B**). Estos resultados concuerdan con los previamente presentados en la **Figura 4.I.3B**.

Los resultados obtenidos sugieren que las defensas primarias de 'Okitsu' podrían actuar como una barrera frente al ingreso de *Xanthomonas* spp., y en consecuencia la resistencia se lograría sin el requerimiento de la muerte celular programada de la célula hospedadora.

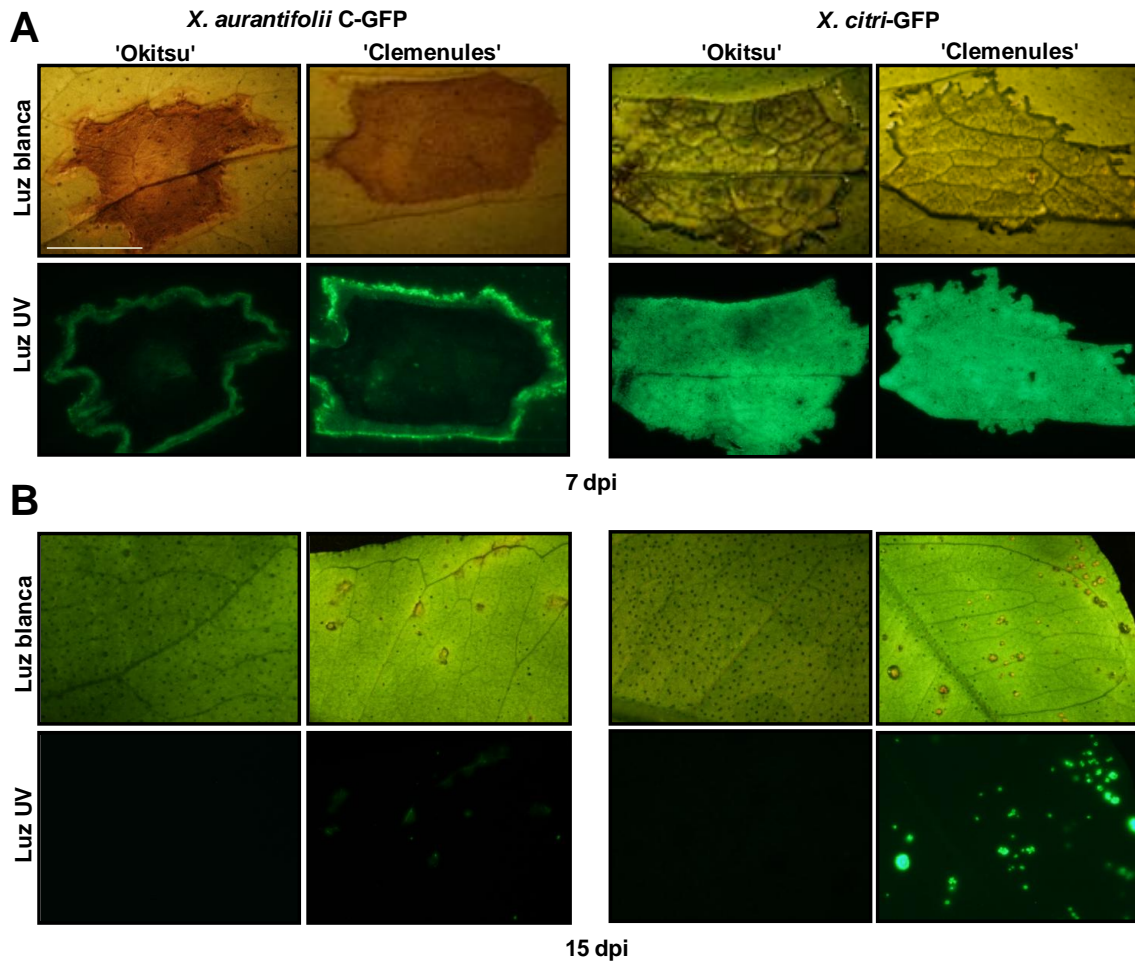


Figura 4.I.5. La superficie de las hojas de 'Okitsu' tiene gran influencia sobre el ingreso de *Xanthomonas* spp. al mesófilo. Síntomas macroscópicos en hojas de mandarinos inoculadas a los 18 días de edad con las cepas de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* C y *Xanthomonas citri* subsp. *citri* transformadas con proteína verde fluorescente (*X. aurantifolii* C-GFP y *X. citri*-GFP). Las suspensiones bacterianas se prepararon en 10 mM MgCl₂ y se inocularon en la cara abaxial de las hojas mediante dos métodos diferentes: **A-** Infiltración (10³ ufc/ml). **B-** Aspersión (10⁷ ufc/ml). Las hojas se fotografiaron bajo lupa con luz blanca y luz UV (λ 520 nm), respectivamente. El experimento se repitió en al menos tres hojas de cuatro plantas diferentes para cada cultivar con resultados similares. Barra: 10 mm.

4.I.3. Discusión

La cancrrosis bacteriana de los cítricos es una enfermedad endémica en todas las regiones cítricas argentinas desde el año 2002 (Canteros, 2004; Stein *et al.*, 2007). El reemplazo de los genotipos susceptibles que se cultivan actualmente por otros con resistencia total o parcial, es una de las estrategias más sustentables para el manejo de esta enfermedad (Viloria *et al.*, 2004). Sin embargo, la caracterización de la resistencia a *X. citri* en cítricos ha comenzado recientemente, de manera que las causas de este comportamiento no están completamente dilucidadas en todos los cultivares (Chen *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2012; Khalaf *et al.*, 2007; Khalaf *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos hasta el presente revelan algunos de los factores que contribuyen a la resistencia a la cancrrosis en el genotipo de mandarina 'Okitsu', tanto bajo condiciones de campo como bajo condiciones de crecimiento controladas.

4.I.3.1. La menor duración del período de susceptibilidad de los brotes de 'Okitsu' podría contribuir al manejo integrado de la cancrrosis en este cultivar

La máxima susceptibilidad a la infección por *X. citri* ocurre cuando las hojas alcanzan entre un 50 y 80% de expansión (Gottwald & Graham, 1992; Stall *et al.*, 1982). De acuerdo a los estados fenológicos registrados en el campo durante los años 2009 y 2010, ocurre un tránsito más rápido entre los estados fenológicos BBCH 15 y BBCH 19 en los brotes de 'Okitsu' en comparación con los de 'Clemenules' (**Figura 4.I.1 B**). Por lo tanto, los brotes de 'Okitsu' están expuestos por un período más corto de tiempo que los brotes de 'Clemenules' a la infección por *X. citri*. Este acortamiento del período de susceptibilidad durante los meses primaverales es muy importante, debido a que en esta época se manifiestan en la zona central de Santa Fe las condiciones climáticas predisponentes a la enfermedad, como mayores precipitaciones, mayor velocidad media del viento y mayor número de días con tormenta (García *et al.*, 2002). Estos factores explican por qué en las

mediciones a campo 'Okitsu' presentó valores de incidencia y severidad significativamente menores que 'Clemenules' durante los dos años de seguimiento (**Figura 4.I.1 C**).

Considerando que los bactericidas cúpricos utilizados para controlar la cancrrosis no poseen efecto sistémico, estos productos deben ser pulverizados necesariamente cuando las plantas presentan sus tejidos en estado susceptible, es decir, luego de la emisión de las brotaciones (Gottwald & Timmer, 1995; Leite Jr. & Mohan, 1990), y desde que los frutos tienen 2 a 6 cm de diámetro según los cultivares (Graham *et al.*, 1992a). El tiempo y número de aplicaciones de cobre para un control efectivo depende de la susceptibilidad del cultivar, de la edad de la planta, las condiciones ambientales y la adopción de otras medidas de control (Gottwald *et al.*, 2002). En general, son necesarias 3 a 5 pulverizaciones en cultivares con un nivel de resistencia medio (Leite Jr. & Mohan 1990), mientras que en los años con condiciones climáticas altamente favorables para la enfermedad son recomendadas hasta más de 6 aplicaciones (Leite Jr. *et al.*, 1987; Leite Jr. & Mohan, 1990). En base a los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral se propone reducir al mínimo las aplicaciones de bactericidas cúpricos en brotes de 'Okitsu', contribuyendo de este modo a un manejo integrado de la enfermedad.

4.I.3.2. La resistencia a cancrrosis en el cv. 'Okitsu' depende de la integridad de las barreras superficiales de las hojas

Muchos estudios de patogenicidad de *X. citri* y de otras bacterias fitopatógenas se han focalizado principalmente en la interacción posterior al ingreso de la bacteria al tejido de las plantas. Esto se debe en parte a la extensa difusión de los métodos de inoculación que depositan la bacteria artificialmente en el mesófilo, como la infiltración. La infiltración, destruye mecánicamente a las barreras constitutivas de defensa de la planta, como la cutícula y la pared celular. Las nuevas evidencias sugieren que estos procedimientos de inoculación pueden haber impedido el descubrimiento de importantes mecanismos involucrados en los estadios tempranos de la interacción del patógeno con la planta (Melotto *et al.*, 2006).

Si bien en muchos cultivares de cítricos y géneros relacionados, se encontró que existe resistencia a la cancrrosis bacteriana aún después de introducir bacterias en el mesófilo por el método de infiltración, este tipo de resistencia, conocida como resistencia del mesófilo, no es absoluta, sino cuantitativa, expresada por un bajo número de lesiones comparado con cultivares más susceptibles. Algunos genotipos que comparten esta categoría son: el 'Dalan Dan', un cultivar similar a pomelo (*Citrus paradisi*), el limequat (*Citrus aurantifolia* x *Fortunella japonica*) 'Lakeland', el calamondin (*Citrus mitis*), y las especies *C. ichangensis* y *C. junos* (Deng *et al.*, 2009; Gochez & Canteros, 2008; Gottwald *et al.*, 1993; Vilorio *et al.*, 2004). En este trabajo de Tesis Doctoral se ha demostrado que cuando las hojas de los cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu' son inoculadas por el método de infiltración, no se encuentran diferencias en el desarrollo de canchros, independientemente de la edad de la hoja inoculada (**Figura 4.I.2 A**).

La formación de los síntomas de cancro depende de una buena adherencia y formación de biofilm en la superficie de las hojas (Rigano *et al.*, 2007). El método de inoculación por aspersión permite que estos procesos ocurran tal como sucederían en el campo y por lo tanto, permite que actúen las barreras primarias frente a la infección de *X. citri*. Utilizando éste método, se demostró que *X. citri* coloniza la superficie de las hojas del cv. 'Clemenules' formando microlonias, particularmente sobre las uniones de las células epidérmicas y alrededor de los estomas. Las microlonias evolucionan en el tiempo a biofilms maduros y finalmente desarrollan canchros. En contraste, en la superficie de las hojas de 'Okitsu' se observa una clara reducción en el número de bacterias adheridas y en la formación de biofilm luego de 7 dpi (**Figura 4.I.4**). En consecuencia, las diferencias en las propiedades de la superficie de las hojas entre ambos cultivares de mandarina influyen el crecimiento epifítico, la adherencia y la formación de biofilm de *X. citri*. Específicamente, la superficie de las hojas de 'Okitsu' parece interferir con factores bacterianos que son clave para la colonización de *X. citri* y el posterior establecimiento de la enfermedad, cumpliendo una función de barrera de defensa primaria frente al patógeno. Las barreras de defensa primarias de 'Okitsu' también protegen a la planta del ingreso de la cepa avirulenta *X. aurantifolii* tipo C, y por lo tanto, la resistencia se consigue

sin el requerimiento de la HR, que se desarrolla sólo si la bacteria ingresa al mesófilo (**Figura 4.I.5**). Dado que las diferencias en comportamiento entre cultivares son máximas cuando las hojas son inoculadas por aspersión en estadios tempranos (**Figura 4.I.2 B**), se propone que las barreras primarias superficiales se desarrollan más rápido en el cultivar 'Okitsu', en concordancia con el más rápido desarrollo fenológico a campo en este cultivar (**Figura 4.I.1 B**).

La cutícula es la primera barrera física de defensa de la superficie de las plantas que las protege de los patógenos. Está compuesta de cutina, un poliéster derivado de lípidos, y de ceras cuticulares (Beattie, 2002). Ha sido demostrado que el espesor y la composición de esta matriz hidrofóbica extracelular puede influenciar la colonización bacteriana de las hojas (Bessire *et al.*, 2007; Marcell & Beattie, 2002; Whipps *et al.*, 2008). Cutículas más cerosas y espesas interfieren con las poblaciones epifíticas bacterianas, inhibiendo el mojado foliar y limitando la solubilización y difusión de nutrientes desde la hoja (Lindow & Brandl, 2003; Whipps *et al.*, 2008). La cutícula se desarrolla rápido durante el proceso de expansión de las hojas de los cítricos y los últimos estadios (i.e. dos tercios a expansión completa) coinciden con un rápido desarrollo de esta barrera protectora (Graham *et al.*, 1992b). El desarrollo fenológico más acelerado de las hojas de 'Okitsu' durante el período de susceptibilidad a cancrisis a campo, podría estar asociado a un rápido espesamiento de la cutícula en este cultivar. Una cutícula más espesa podría impedir el ingreso a través de los estomas en 'Okitsu', debido a que en los cítricos la capa cuticular forma una cubierta alrededor de las células oclusivas, creando una antecámara sobre el poro estomático (Graham *et al.*, 1992b).

Ha sido sugerido que el número y anatomía de los estomas podrían contribuir a la respuesta diferencial hallada entre un genotipo de kumquat resistente y un genotipo de naranja susceptible durante a la infección con *X. citri* (Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, Graham *et al.* (1992b) no pudieron asociar las diferencias en resistencia a cancrisis de siete especies diferentes de *Citrus* con el área de apertura y la densidad estomática.

Los resultados hasta aquí presentados en este trabajo de Tesis sugieren que factores específicos de la superficie de las hojas de 'Okitsu', tales como características de la cutícula, permeabilidad y/o densidad y apertura estomática, asociados todos con el estado fenológico de la hoja, estarían involucrados en la resistencia a la infección por *Xanthomonas* formadoras de cancro en cítricos.

Capítulo II

Análisis de las barreras de defensa de las hojas de 'Okitsu' y 'Clemenules' y su relación con la resistencia a *X. citri*

4.II.1. Resumen

En el capítulo I se ha demostrado que la resistencia a canchros en el cv. 'Okitsu' se “quiebra” cuando las hojas son inoculadas con *X. citri* por el método de infiltración, y que por lo tanto, la resistencia en este cultivar depende de la integridad de las barreras superficiales de las hojas. Entre los factores específicos de la superficie de las hojas que podrían contribuir a la resistencia se encuentran las características de la cutícula, permeabilidad cuticular, densidad y apertura estomática. Estos factores van sufriendo modificaciones a medida que las hojas se expanden, por lo cual su desarrollo está íntimamente ligado al estado fenológico de la hoja. Debido a que las diferencias entre ambos cultivares en la susceptibilidad a *X. citri* fueron mayores en hojas inoculadas entre los 15 y 22 días de edad, resulta de especial importancia analizar las posibles barreras de defensa en este estadio en particular, en comparación con un estadio posterior en el cual las diferencias se minimizan.

En el presente Capítulo de Resultados se plantearon los siguientes objetivos: i) Determinar la densidad y respuesta estomática en hojas de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu'; ii) Caracterizar histológicamente las hojas de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu' en distintos estadios de desarrollo; iii) Caracterizar a nivel ultraestructural la morfología de la capa epidérmica de las hojas en los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu'; iv) Cuantificar los niveles de ceras cuticulares y la permeabilidad cuticular de las hojas de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu'; v) Estudiar los cambios ultraestructurales inducidos por *X. citri* durante el período de susceptibilidad en hojas de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu'.

4.II.2. Resultados

4.II.2.1. La densidad estomática no está asociada a las diferencias en susceptibilidad a *X. citri* de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu'

Las plantas controlan el tamaño de los estomas mediante la regulación de la presión osmótica de dos células oclusivas, con forma arriñonada, que rodean las aberturas de los estomas u ostíolo. En los cítricos, la capa cuticular se prolonga por encima de las células oclusivas, creando una antecámara sobre el poro estomático. En estas especies existen característicamente dos tipos de estomas, grandes y pequeños. Los más pequeños son cincuenta veces más abundantes que los grandes, y se ha comprobado que los tamaños de ambos están correlacionados entre sí (Graham *et al.*, 1992b).

El cierre de los estomas es una de las respuestas más tempranas de la planta a las señales de estrés abiótico y biótico (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Melotto *et al.*, 2006; Montillet & Hirt, 2013). El ácido abscísico es la principal hormona involucrada en la compleja red de señalización que induce el cierre estomático (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). En 2006, Melotto *et al.* demostraron que los estomas de *Arabidopsis* se cierran 1 a 2 h después del reconocimiento de la bacteria *Pseudomonas syringae*, impidiendo su entrada y actuando en las primeras fases de la PTI. Esta respuesta estomática está asociada al reconocimiento de PAMPs bacterianos, tales como la flagelina, por el receptor FLS2 (del inglés *flagelin sensing 2*) (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Sin embargo, en las interacciones compatibles, las bacterias consiguen superar esta PTI, a través de factores de virulencia como la coronatina de *P. syringae* u otros factores desconocidos en *X. campestris*, y luego de 4 h reabren los estomas para poder ingresar así al mesófilo (Gudesblat *et al.*, 2009; Melotto *et al.*, 2006).

Con el objetivo de estudiar si la resistencia del cultivar 'Okitsu' está relacionada con una menor densidad estomática, se realizaron impresiones de epidermis de hojas de 18 días de los cultivares 'Clemenules' y 'Okitsu', debido a que en este estadio las diferencias de susceptibilidad a cancrisis entre ambos cultivares son máximas (**Capítulo I**). No se

encontraron diferencias significativas en el número de estomas promedio por mm², que fue de 1.004 ± 41 en 'Clemenules' y de 943 ± 64 en 'Okitsu'. Por lo tanto, en los dos genotipos de mandarina estudiados, *X. citri* presenta un número similar de estomas que funcionan como puerta de ingreso al mesófilo.

Por otro lado, se estudió la capacidad de *X. citri* para promover la apertura/cierre estomático luego de asperjar el inóculo sobre las hojas de 18 y 36 días de edad. Como controles de cierre y apertura se realizaron aplicaciones exógenas de 10 µM ácido abscísico (ABA) y 10 mM MgCl₂, respectivamente. La apertura estomática se cuantificó luego de 1 y 4 horas post-tratamiento (hpt), a partir de impresiones de epidermis en portaobjetos.

Es importante destacar que en hojas de 18 días de edad, independientemente del tratamiento, la apertura estomática fue siempre significativamente menor en 'Okitsu' que en 'Clemenules' (**Figura 4.II.1 A y B**). En ambos cultivares la apertura estomática no se modificó notablemente entre 1 y 4 hpt con ABA y MgCl₂. Asimismo, la aspersion de *X. citri* indujo una apertura estomática semejante al ABA a 1 y 4 hpt en 'Okitsu'. De igual forma, la apertura estomática generada a 1 hpt por *X. citri* en 'Clemenules' fue similar a la del ABA. No obstante, a las 4 hpt la bacteria induce la apertura de los estomas a niveles superiores que los del ABA en este cultivar. La apertura de los estomas en plantas de 'Clemenules' inoculadas con *X. citri* luego de 4 hpt fue significativamente superior a la de 'Okitsu'. El hecho de que el MgCl₂ genere una mayor apertura estomática que *X. citri* en ambos cultivares, indica que los estomas de los dos mandarinos reconocen a la bacteria, induciendo una respuesta de defensa estomática (**Figura 4.II.1 A y B**).

Por otro lado, en hojas de 36 días de edad, se redujeron notablemente las diferencias en apertura estomática entre ambos cultivares para todos los tratamientos efectuados. Las aperturas estomáticas en estas hojas fueron menores que en las de 18 días para todos los tratamientos, posiblemente debido a que las antecámaras cuticulares que se forman sobre las células oclusivas son mayores (**Figura 4.II.1 A**).

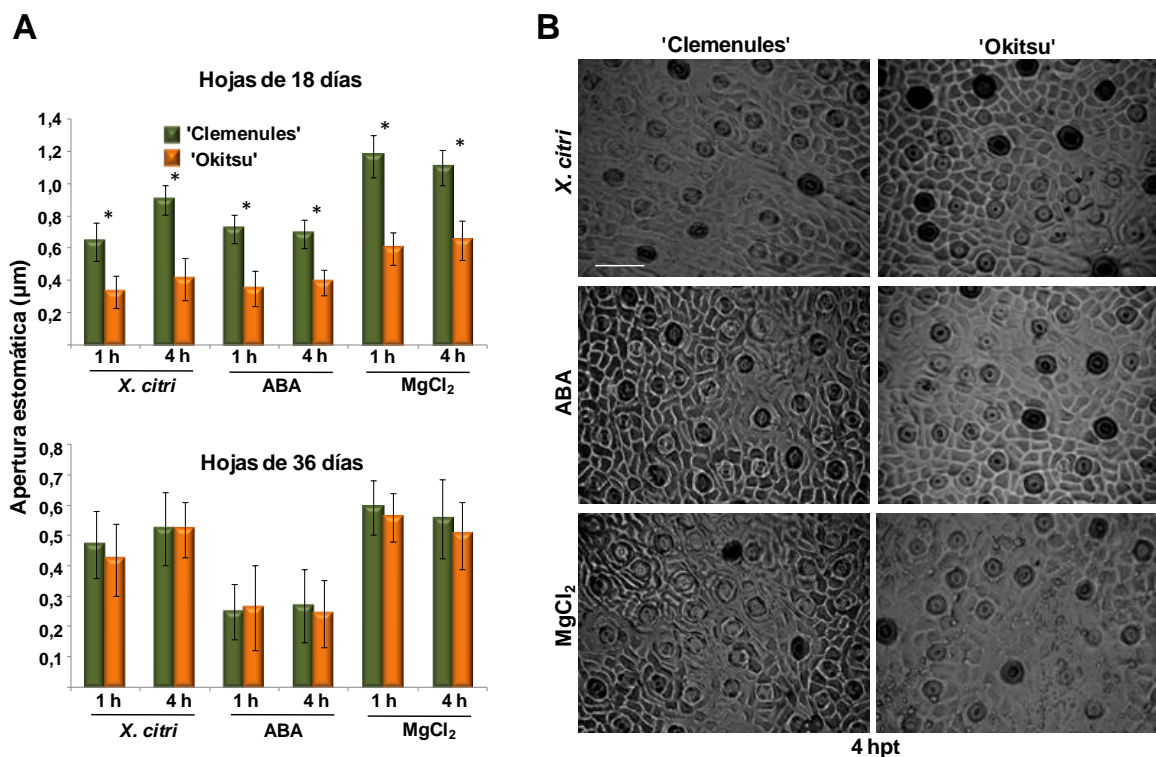


Figura 4.II.1. Apertura estomática en hojas de diferentes estadios de desarrollo de los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu'. **A-** Apertura estomática determinada en impresiones de epidermis luego de 1 y 4 horas post-tratamiento (hpt), en tratamientos por aspersión con 10 µM de ácido abscísico (ABA); 10 mM de MgCl₂; y *X. citri* (10⁷ ufc/ml). La apertura se cuantificó utilizando el programa Image J v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Por cada cultivar se analizaron 5 hojas, de las cuales se observaron dos campos seleccionados al azar. Los datos marcados con asterisco difieren significativamente entre ambos cultivares de acuerdo al test t de Student, $P < 0,05$. **B-** Imágenes representativas del promedio para cada tratamiento en hojas de 18 días a 4 hpt. Barra: 50 µm.

4.II.2.2. Características histológicas de las hojas de los cultivares 'Okitsu' y 'Clemenules' en diferentes estadios de desarrollo

Con el objetivo de estudiar si la resistencia diferencial del cv. 'Okitsu' con respecto a 'Clemenules' se debe a diferencias anatómo-histológicas de la superficie de la hoja, se realizaron cortes transversales de hojas de 18, 21 y 36 días de edad de ambos cultivares. Se observó la disposición de los estomas, la proporción de los diferentes tejidos y su variación a medida que la hoja crece. Como se observa en la **Figura 4.II.2**, ambos cultivares de mandarina presentan epidermis monoestratificadas y glabras, cuyas células presentan

paredes delgadas, íntimamente unidas entre sí. Las células epidérmicas propiamente dichas de la epidermis abaxial se interrumpen por los estomas que se ubican al mismo nivel que las demás células epidérmicas adyacentes. Debido a que los estomas se encuentran sólo en la epidermis abaxial de los cítricos las hojas se consideran hipostomáticas. Como ocurre típicamente en las hojas de los cítricos, se observa gran cantidad de idioblastos, conteniendo cristales de oxalato de calcio, entre las células epidérmicas y la primera capa de parénquima en empalizada. Las hojas son de tipo bifacial y dorsiventral, presentan 2 a 3 capas de parénquima en empalizada debajo de la epidermis adaxial, seguidas por varias capas de parénquima esponjoso con espacios intercelulares. Tanto en las células del parénquima en empalizada como en las del parénquima esponjoso se observan cloroplastos. El parénquima se interrumpe en algunas zonas por glándulas de aceites esenciales formadas por lisis celular. A medida que la hoja crece, en el parénquima esponjoso se incrementa el tamaño de las glándulas de aceites esenciales y la superficie ocupada por los espacios intercelulares (**Figura 4.II.2**). Es interesante notar, que la principal diferencia estructural observada entre ambos cultivares es el grosor de la cutícula que cubre toda la superficie de la hoja y las cámaras subestomáticas, particularmente en las hojas jóvenes de 18 días de edad del cultivar 'Okitsu'. En este estadio se observa una capa de cutícula levemente engrosada tapizando los estomas y en hojas de 21 días la cutícula fue más gruesa sobre toda la superficie de la hoja. Este engrosamiento de la cutícula no fue observado en los cortes histológicos analizados de 'Clemenules'. En hojas de 36 días la cutícula fue igualmente gruesa en ambos cultivares (**Figura 4.II.2**).

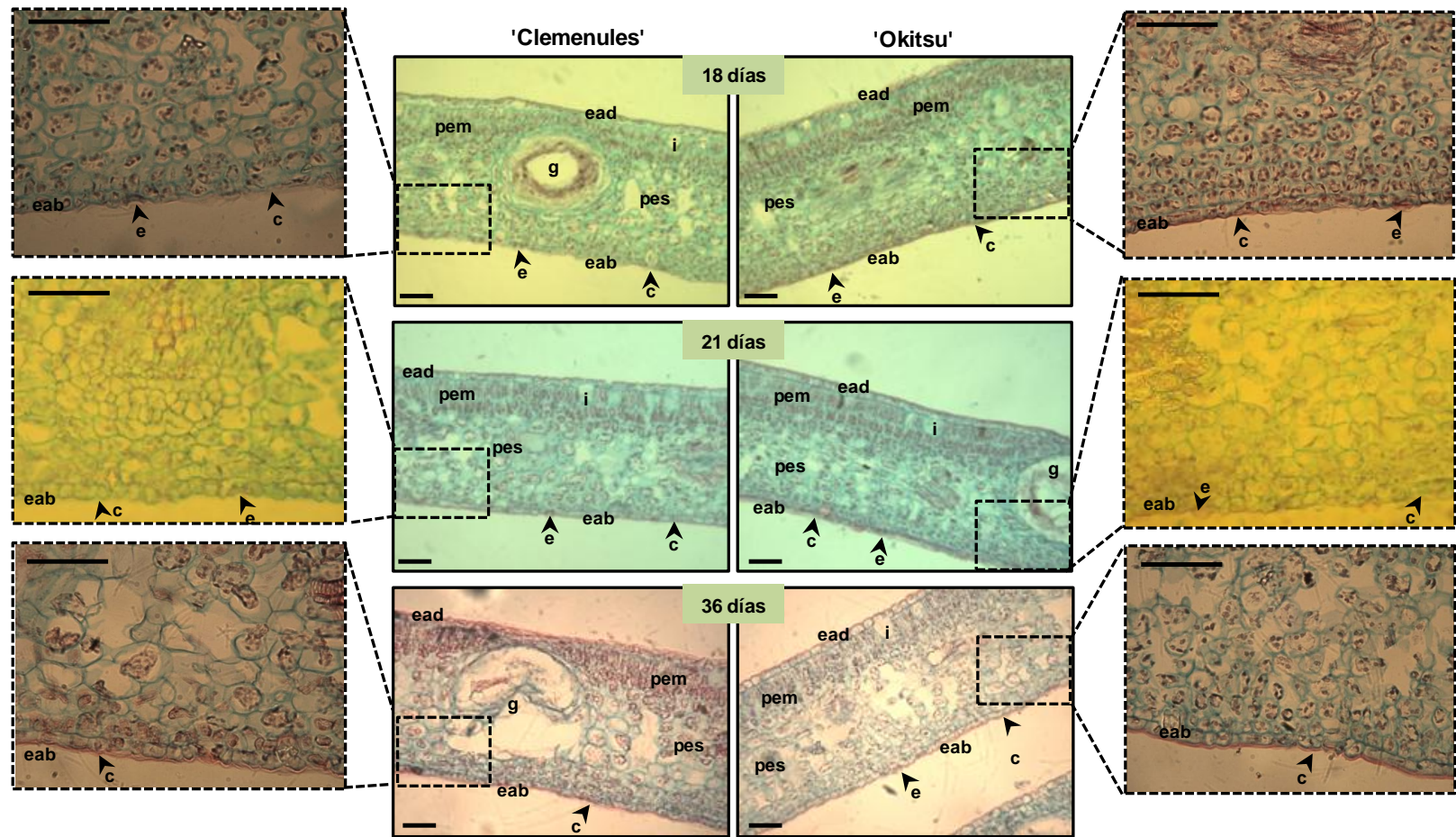


Figura 4.II.2. Cambios en las características histológicas de hojas de los cultivares de mandarina 'Okitsu' y 'Clemenules' con el avance de la edad. Se realizaron cortes transversales de hojas de 18, 21 y 36 días de edad en los cuales se observó la disposición de los estomas, la proporción de los diferentes tejidos y su variación a medida que la hoja crece. El experimento fue repetido utilizando material de tres plantas diferentes para cada cultivar y estadio de crecimiento de la hoja. pem: parénquima en empalizada; pes: parénquima esponjoso; eab: epidermis abaxial; ead: epidermis adaxial; e: estoma; c: cutícula; i: idioblasto; g: glándula. Barra: 50 μ m.

4.II.2.3. Las hojas jóvenes del cv. 'Okitsu' presentan una cutícula de mayor espesor que las hojas de 'Clemenules'.

Para caracterizar a nivel ultraestructural las características de las barreras de defensa pre-existentes en 'Okitsu' frente a *X. citri*, se realizaron cortes transversales de hojas de 18 y 36 días de edad. Los cortes se observaron al microscopio electrónico de transmisión y en las fotografías obtenidas se estudiaron las características de la epidermis, la estructura de los estomas y el grosor de la capa cuticular que los recubre.

En ambos cultivares las células epidérmicas fueron de forma rectangular, con una gran vacuola ocupando ampliamente el citoplasma, como típicamente ocurre en las células epidérmicas de los cítricos (Tadeo *et al.*, 2003). La cutícula presentó una estructura densa y compacta, mostrando un espesor variable de acuerdo al cultivar y edad de la hoja (**Figura 4.II.3**). Notablemente, las hojas de 18 días de 'Okitsu' presentaron una cutícula de mayor espesor que las hojas de 'Clemenules' sobre las células epidérmicas propiamente dichas. Resulta interesante destacar que la cutícula de 'Okitsu' penetra profundamente entre las uniones de las células epidérmicas, produciendo el proceso conocido como cuticularización de las paredes anticlinales (Buda *et al.*, 2009), generando una superficie lisa sobre la epidermis. En cambio, en 'Clemenules' la cutícula sólo tapiza superficialmente la pared superior de las células epidérmicas formándose cavidades entre las uniones de las células epidérmicas que podrían favorecer la acumulación de agua (**Figura 4.II.3 A**).

Las células oclusivas que conforman los estomas en diferentes especies están cubiertas también por cutícula, y en muchas especies, incluidos los cítricos, la cutícula forma prolongaciones que cubren a modo de apéndices el poro estomático, formando una antecámara (Graham *et al.*, 1992b). Estas prolongaciones cuticulares fueron de mayor espesor en 'Okitsu' que en 'Clemenules' en las hojas de 18 días (**Figura 4.II.3 B**). El espesor de la cutícula sobre las células epidérmicas propiamente dichas y en los rebordes cuticulares de los estomas fue un 71 y un 72% superior en 'Okitsu' que en 'Clemenules', respectivamente (**Figura 4.II.3 C**).

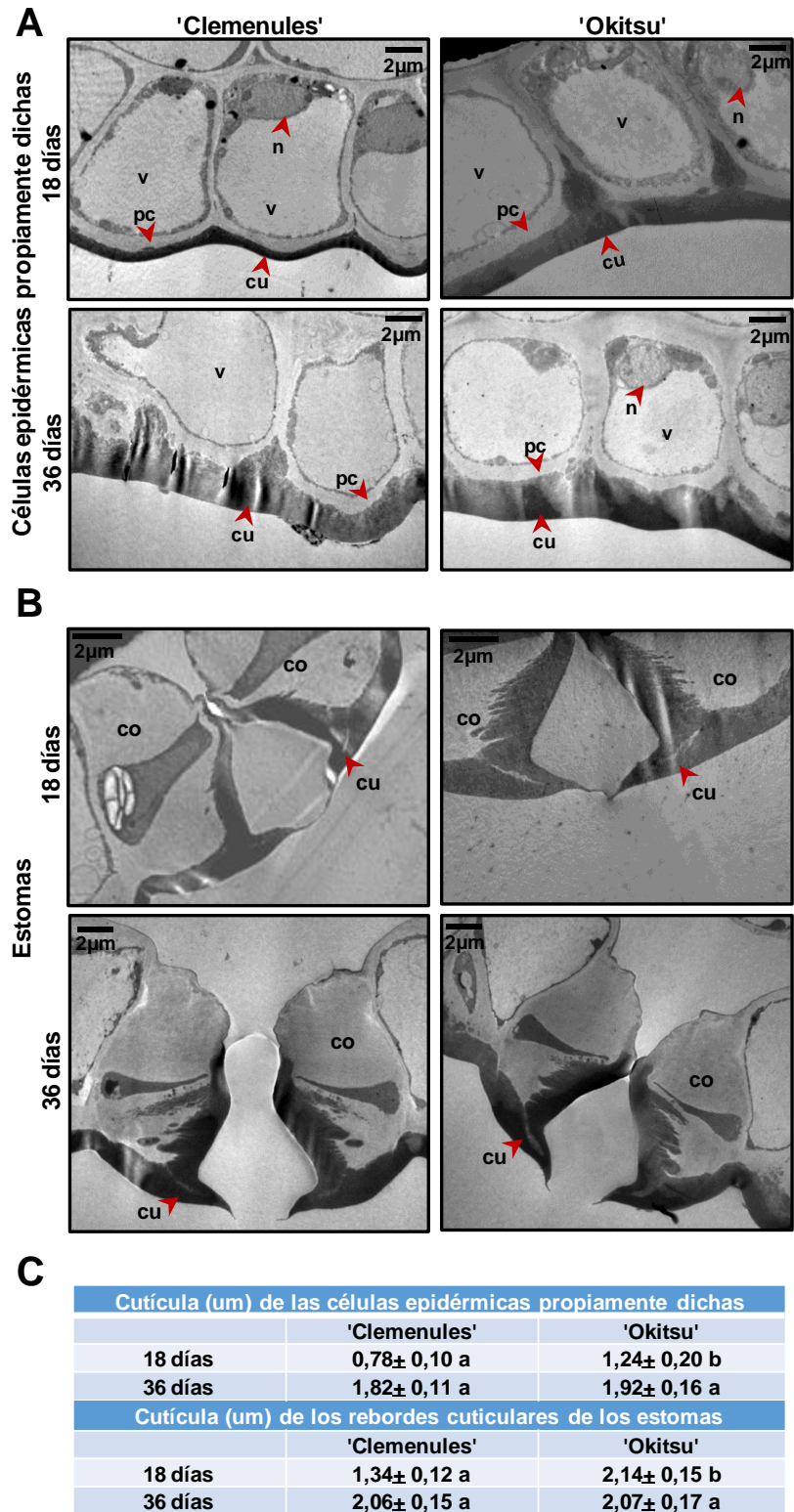


Figura 4.II.3. Características de la capa epidérmica abaxial en diferentes estados de desarrollo de las hojas de los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu'. A- Células epidérmicas propiamente dichas observadas con microscopía electrónica de transmisión. B- Células oclusivas de

los estomas, observadas con microscopía electrónica de transmisión. cu: cutícula; pc: pared celular; n: núcleo; v: vacuola; co: célula oclusiva. C- Espesor cuticular promedio sobre las células epidérmicas propiamente dichas y en los rebordes cuticulares de los estomas. El espesor cuticular se midió en 3 sitios de la epidermis utilizando el programa Image J. Se analizaron al menos 6 fotografías provenientes de 3 muestras diferentes por cada cultivar. Medias seguidas por diferentes letras en la misma columna difieren significativamente de acuerdo al test t de Student ($P < 0,05$).

Por otro lado, en hojas de 36 días, el espesor cuticular fue similar en ambos cultivares tanto sobre las células epidérmicas propiamente dichas como en los rebordes cuticulares de los estomas (**Figura 4.II.3 A y B**). Estos resultados confirman que el desarrollo fenológico más rápido de las hojas de 'Okitsu' está acompañado por una mayor deposición de cutícula en edades tempranas.

Para complementar los resultados anteriores, se cuantificaron las ceras cuticulares en hojas de 18, 21 y 36 días realizando una extracción con cloroformo, de acuerdo al método descrito por Marcell & Beattie (2002). Como se observa en la **Figura 4.II.4**, las hojas de 18 y 21 días de 'Okitsu' poseen una cantidad significativamente mayor de ceras (+110%) que las hojas de igual edad de 'Clemenules'. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre ambos cultivares en la cantidad de ceras en hojas de 36 días de edad.

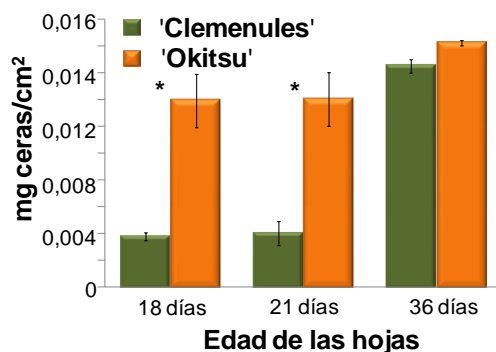


Figura 4.II.4. Cuantificación de las ceras cuticulares en hojas de 18, 21 y 36 días de edad en los cultivares de mandarino 'Okitsu' y 'Clemenules'. Las ceras se extrajeron de las hojas de 4 brotes de cada cultivar con cloroformo de acuerdo a Marcell & Beattie (2002). El experimento se repitió tres veces para cada cultivar y estado de desarrollo de las hojas. Los valores están expresados como la media \pm la desviación estándar. Los datos marcados con asterisco difieren significativamente entre ambos cultivares de acuerdo al test t de Student, $P < 0,05$.

En conjunto, los resultados presentados sugieren que un desarrollo más rápido de la cutícula de la hoja de 'Okitsu' podría contribuir a la mayor resistencia de este cultivar a *X. citri*. Por otro lado, la menor apertura estomática observada en las hojas de 18 días de 'Okitsu' (**Sección 4.II.2.1**) podría deberse al mayor espesor de las prolongaciones cuticulares que recubren las células oclusivas.

4.II.2.4. La cutícula de las hojas jóvenes del cv. 'Clemenules' es más permeable que la de 'Okitsu'

A fin de investigar si las diferencias en el espesor cuticular demostradas entre los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu', están también asociadas con diferencias en la permeabilidad cuticular al agua, se analizó dicho parámetro, utilizando la técnica de permeabilidad al azul de toluidina. Para ello, se cortaron trozos de hojas de 18 días de edad de ambos cultivares de mandarino, se decoloraron en etanol, para visualizar mejor el ingreso del azul de toluidina y se incubaron con este colorante durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo de incubación, a simple vista no se observó tinción azul de ninguna de las porciones de hojas, independientemente del cultivar de mandarino analizado. Sin embargo, al observar las muestras con microscopio óptico se pudo apreciar que los estomas de las hojas de 'Clemenules' se encontraban fuertemente coloreados, lo cual no ocurrió en las hojas de 'Okitsu' (**Figura 4.II.5 A**).

En base a estos resultados, se realizó un experimento similar, pero incubando los trozos de hojas con el colorante durante más tiempo (6h). Como se observa en la **Figura 4.II.5 B**, las hojas de 'Clemenules' fueron significativamente más permeables que las hojas de 'Okitsu', lo cual se apreció macroscópicamente. La permeabilidad del colorante en el tejido vegetal se cuantificó usando diluciones del colorante como patrón. Según los valores obtenidos, las hojas de 'Clemenules' incorporan un 56% más de colorante que las de 'Okitsu' a los 18 días de edad (**Figura 4.II.5 C**).

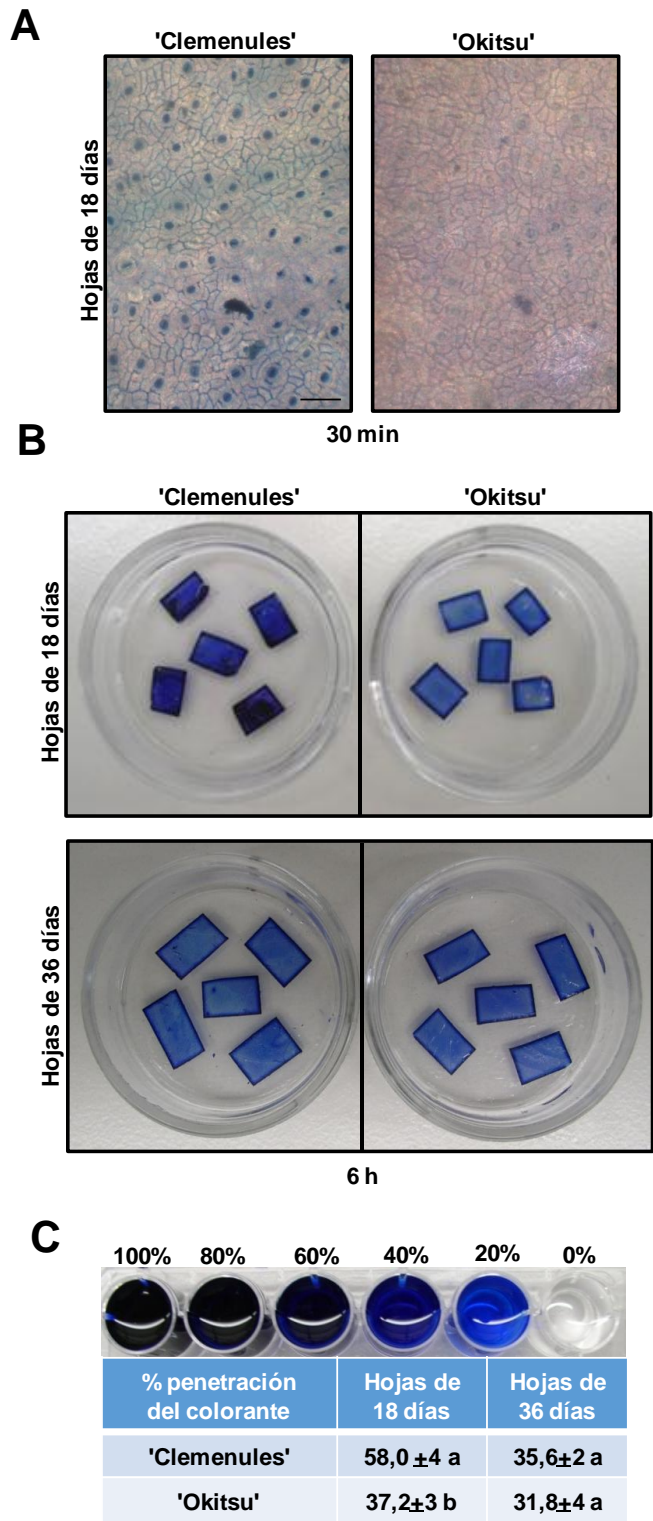


Figura 4.II.5. Permeabilidad cuticular en hojas de 18 y 36 d1as de edad de los mandarinos, cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu'. A- Permeabilidad en hojas de 18 d1as de ambos cultivares evidenciada por la penetraci3n de una soluci3n acuosa de azul de toluidina en la epidermis y observada con microscopio 3ptico. Barra: 50 μm B- Penetraci3n de azul de toluidina en hojas de 18 y 36 d1as

observadas macroscópicamente. C- Medida relativa de la permeabilidad de las hojas a partir de la penetración de azul de toluidina, utilizando diluciones del colorante como patrón y el programa Quantity one. Los valores están expresados como la media \pm la desviación estándar. Medias seguidas por diferentes letras en la misma columna difieren significativamente de acuerdo al test t de Student ($P < 0,05$). El experimento se realizó por triplicado, utilizando 5 trozos de hojas provenientes de distintos brotes.

Por otro lado, cuando se analizó la permeabilidad del colorante en las hojas de 36 días de edad, no se observaron diferencias significativas en la penetración del colorante entre ambos cultivares. Es interesante destacar que la permeabilidad en hojas de 36 días de ambos cultivares es semejante a la permeabilidad de hojas de 'Okitsu' de 18 días de edad (**Figura 4.II.5 B y C**). Estos resultados concuerdan con el aumento en el espesor de la cutícula y la cantidad de ceras en hojas del cultivar 'Okitsu' de 18 días de edad (**Sección 4.II.2.3**).

4.II.2.5. *X. citri* no induce estructuras de defensa en las células del mesófilo de 'Okitsu'

Con el objetivo de confirmar que las barreras superficiales de 'Okitsu' restringen el ingreso de la bacteria al interior del mesófilo, se estudiaron las modificaciones ultraestructurales que ocurren en las hojas luego de la inoculación con *X. citri*. Para ello, se asperjaron con la bacteria (10^7 ufc/ml) hojas de los cv. 'Clemenules' y 'Okitsu' de 18 días de edad y se tomaron muestras a los 6, 11 y 26 dpi para ser procesadas y analizadas utilizando microscopía electrónica de transmisión.

Luego de 6 días de la inoculación con *X. citri*, las células de 'Okitsu' presentaron una morfología normal, con la pared celular sin alteraciones, con una gran vacuola central, y el núcleo y los cloroplastos rodeando la membrana plasmática (**Figura 4.II.6 A**). Estas características de integridad celular se mantuvieron en el cultivar resistente durante todo el tiempo analizado (11 y 26 dpi) (**Figura 4.II.6 B y C**). Cabe destacar que en ninguno de los estadios estudiados se observó presencia de bacterias.

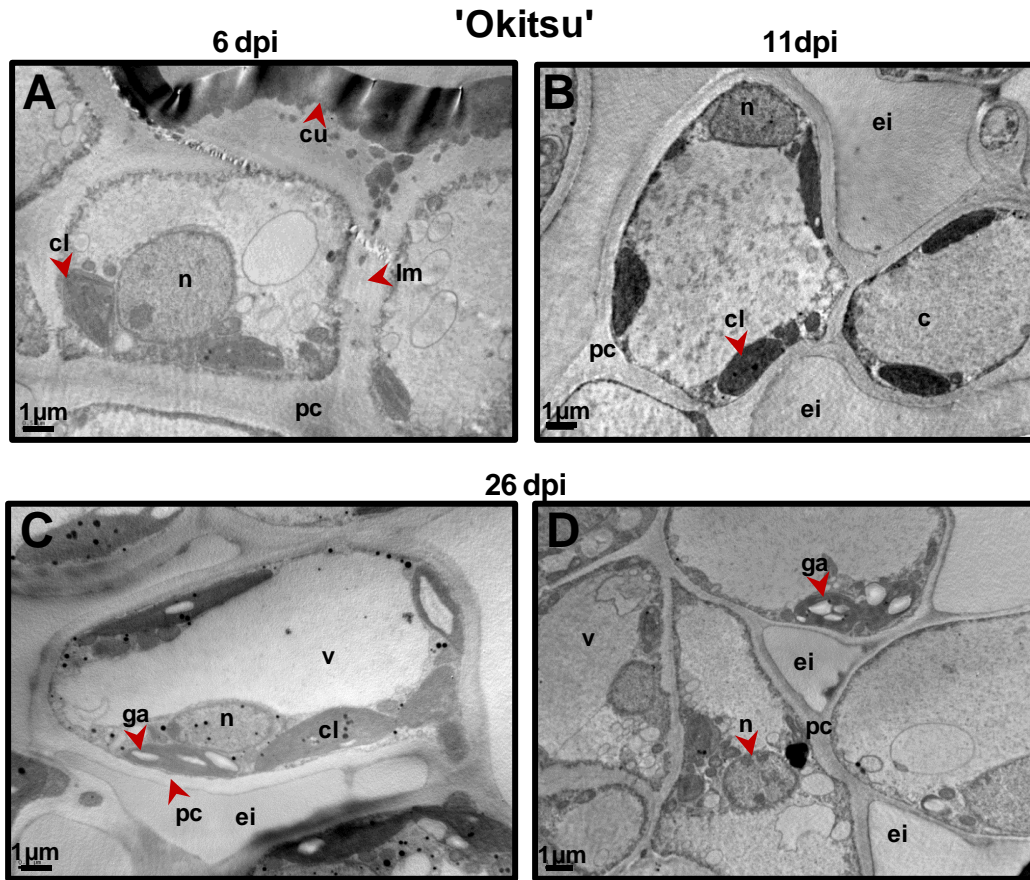


Figura 4.II.6. *X. citri* no induce estructuras de defensa en el mesófilo de las hojas de 'Okitsu'. Morfología de las células de 'Okitsu' **A-** A los 6 días post-inoculación (dpi); **B-** A los 11 dpi; y **C-** A los 26 dpi. Las células mostraron una morfología normal en todos los estadios, y no se observó presencia de bacterias. c: citoplasma; cu: cutícula; pc: pared celular; n: núcleo; v: vacuola; cl: cloroplasto; ei: espacio intercelular; lm: laminilla media; ga: gránulos de almidón.

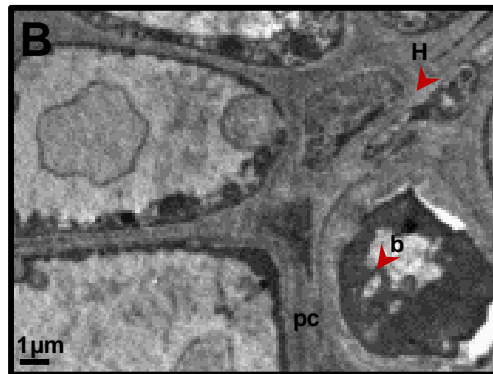
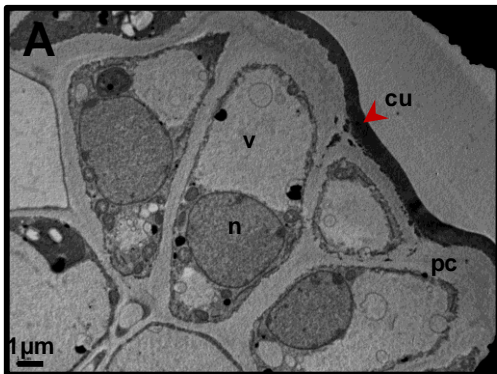
Por otro lado, a los 6 dpi, en la mayoría de las muestras analizadas de 'Clemenules' las características celulares fueron semejantes a las de 'Okitsu', no observándose alteraciones en las células (**Figura 4.II.7 A**). No obstante, en algunas muestras se encontraron unas pocas bacterias comenzando a proliferar en los espacios intercelulares (**Figura 4.II.7 B**). A los 11 dpi, los sitios colonizados por la bacteria aumentaron con respecto a los 6 dpi en y se observó colapso de las células vegetales (**Figura 4.II.7 C**). En la fotografía mostrada puede notarse además la deposición de material fibrilar para fusionar dos paredes celulares, en un intento de limitar los espacios intercelulares colonizados por bacteria (**Figura 4.II.7 C**). A los 26 dpi, se pronunciaron aún más las alteraciones

ultraestructurales. En los sectores menos afectados, todavía se observaron células muy vacuoladas y con algunas organelas en proceso de degeneración. En simultáneo, se percibieron estrechamientos de la pared celular en áreas en contacto con las bacterias (**Figura 4.II.7 D**). En estas células, la membrana plasmática fue difícil de distinguir debido a su similitud con el material electro-denso liberado por la degeneración de la pared celular, que también rodea a las bacterias. En otros sectores de la hoja, las células de 'Clemenules' se mostraron completamente hipertrofiadas, presentando colapso de paredes celulares y membranas, y material electro-denso en reemplazo del citoplasma (**Figura 4.II.7 E**). Fotografías tomadas en otras hojas presentaron modificaciones semejantes, con una extensa colonización de los espacios intercelulares por *X. citri* (**Figura 4.II.7 F y G**). La observación de las bacterias con mayores magnificaciones demostró que poseían citoplasma intacto, una gruesa pared celular y material cromosómico (**Figura 4.II.7 H y I**).

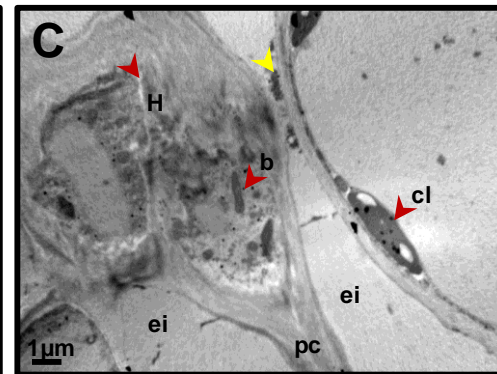
Estos resultados confirman que *X. citri* no induce estructuras de defensa en las células del mesófilo de 'Okitsu'. Además, la bacteria no consigue ingresar ni colonizar el interior de las hojas en este cultivar, debido a que existe una mayor deposición de cutícula en edades tempranas. En conjunto, los resultados presentados comprueban que el desarrollo más rápido de la cutícula de la hoja de 'Okitsu' contribuye a la mayor resistencia de este cultivar a *X. citri*.

'Clemenules'

6 dpi



11dpi



26dpi

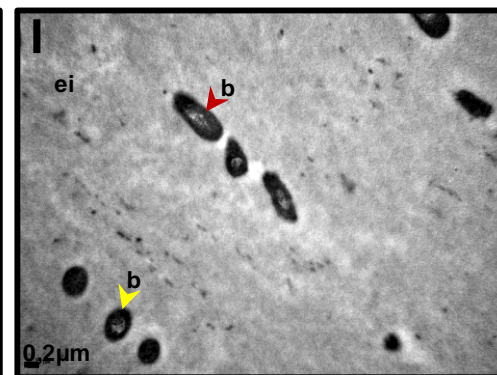
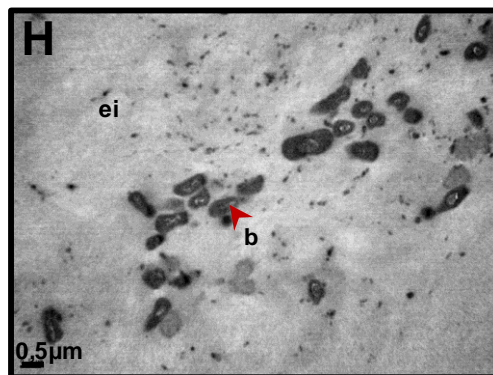
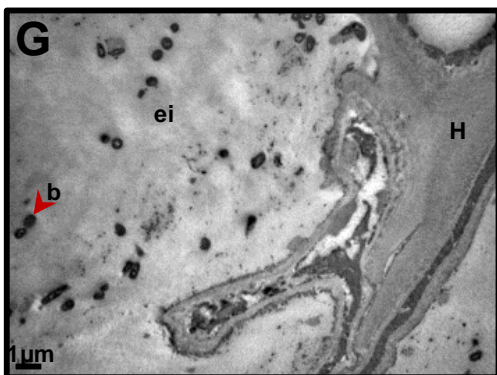
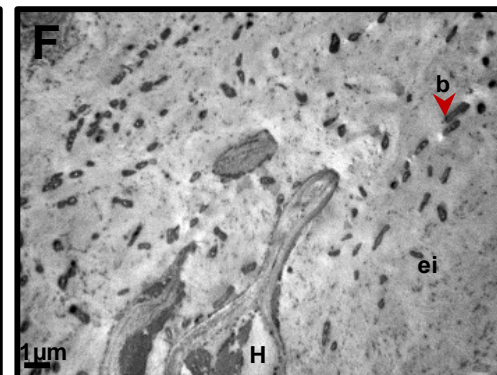
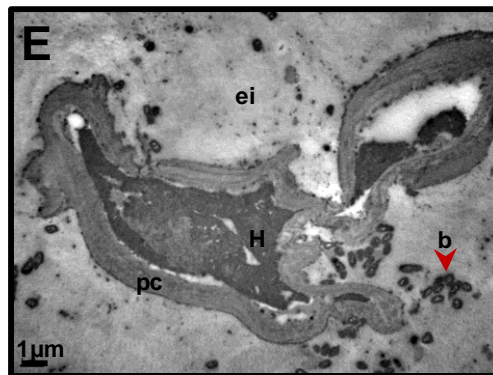
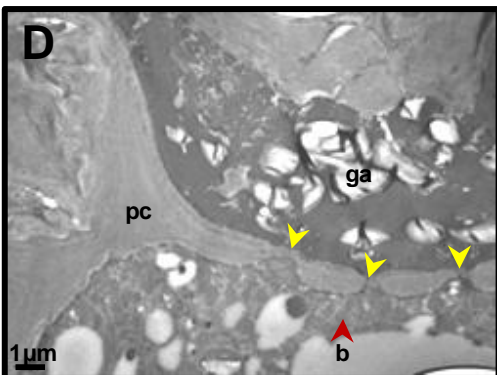


Figura 4.II.7. *X. citri* induce cambios ultraestructurales en el mesófilo de hojas de 'Clemenules'. Morfología de las células de 'Clemenules' **A-** A los 6 días post-inoculación (dpi) la mayoría de las células mostraron una morfología normal. **B-** En algunas muestras se observaron unas pocas bacterias comenzando a proliferar en los espacios intercelulares a los 6 dpi. **C-** Luego de 11 días dpi se observó colapso de células y presencia de bacterias. La flecha amarilla señala la fusión de dos paredes celulares mediante la deposición de material fibrilar. **D-** A los 26 dpi, en los sectores menos afectados, se observan células con algunas organelas en proceso de degeneración y estrechamientos de la pared celular en áreas en contacto con las bacterias (flechas amarillas). **E-, F- y G-** En otras muestras, las alteraciones estructurales se incrementaron a los 26 dpi, la hipertrofia fue evidente y se observó una extensa colonización de los espacios intercelulares. **H- e I-** La observación de las bacterias con mayores magnificaciones demostró que poseían citoplasma intacto, una gruesa pared celular y material cromosómico. La flecha amarilla señala una bacteria en corte transversal y la roja en su vista longitudinal. cu: cutícula; pc: pared celular; n: núcleo; v: vacuola; cl: cloroplasto; ei: espacio intercelular; ga: gránulos de almidón; b: bacteria; H: hipertrofia.

4.II.3. Discusión

4.II.3.1. El desarrollo más rápido de la cutícula de la hoja de 'Okitsu' contribuye a la mayor resistencia a *X. citri*

La filosfera de las plantas comprende tanto la superficie como el interior de las hojas, y constituye uno de los nichos más importantes para los microorganismos. Luego de que las bacterias arriban a la superficie de la filosfera, una gran variedad de factores determina el éxito de la colonización. Las células epidérmicas producen protuberancias y depresiones, cuya magnitud depende del cultivar y especie vegetal, que influenciarán la forma y extensión de las gotas de agua sobre la planta (Lindow & Brandl, 2003). Ha sido comprobado que las bacterias se ubican preferencialmente en sitios protegidos sobre la superficie de las hojas, como por ejemplo las depresiones que se forman en la cutícula, entre las uniones de las células epidérmicas y alrededor de los estomas (Beattie & Lindow, 1999; Whipps *et al.*, 2008). Además, el crecimiento epifítico de la bacteria induce la producción de una matriz de exopolisacáridos (EPS), la cual reduce su exposición a la superficie cuticular de las plantas (Beattie & Lindow, 1999; Rigano *et al.*, 2007). Las bacterias que se ubican en sitios protegidos en general resisten el lavado y el tratamiento con químicos como etanol y peróxido de hidrógeno, o radiación UV (Beattie & Lindow, 1999). En este sentido, resulta de gran relevancia remarcar una de las diferencias estructurales que se observó entre los cultivares de mandarina 'Clemenules' y 'Okitsu'. En la superficie cuticular de 'Clemenules' se forman cavidades que podrían permitir la acumulación de humedad, constituyendo sitios protegidos que permiten que *X. citri* presente un mayor "fitness" epifítico en este cultivar, favoreciendo su posterior crecimiento endofítico (**Figura 4.I.3 y 4.I.4; Capítulo I**). Por el contrario, el fenómeno de cuticularización de las paredes anticlinales de las células epidérmicas que ocurre en 'Okitsu' permite que se forme una superficie cuticular lisa, sin ondulaciones (**Figura 4.II.3**). De manera similar a lo que ocurre en las hojas de 'Clemenules', mutantes de tomate deficientes en cutina, que presentan una reducción de la cuticularización de las paredes

anticlinales de las células epidérmicas, son más susceptibles al hongo *Botrytis cinerea* y a otros patógenos oportunistas (Isaacson *et al.*, 2009).

Los resultados presentados en este Capítulo demuestran que la cutícula se desarrolla rápido durante el proceso de expansión de las hojas de 'Okitsu', en un período crítico de susceptibilidad a cancrisis. Las hojas del cultivar susceptible 'Clemenules', alcanzan un espesor cuticular similar al de hojas de 18 días de 'Okitsu' sólo alrededor de los 36 días de edad (**Figura 4.II.3**). Ha sido demostrado que cutículas más cerosas y espesas interfieren con las poblaciones epifíticas bacterianas, inhibiendo el mojado foliar y limitando la solubilización y difusión de nutrientes desde la hoja (Lindow & Brandl, 2003; Whipps *et al.*, 2008). La cutícula de las hojas de 18 días de 'Okitsu' no sólo es más espesa que la de 'Clemenules', sino que además presenta una permeabilidad al agua reducida (**Figura 4.II.5**). Notablemente, ha sido demostrado que algunas bacterias que viven como epifitas en la filosfera de *Hedera* sp. y *Prunus* sp. tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium fascians* y *Xanthomonas campestris*, son capaces de incrementar la permeabilidad al agua de la cutícula, aumentando así la disponibilidad de agua y de nutrientes en la filosfera (Schreiber *et al.*, 2005). Se desconoce si *X. citri* es capaz de realizar este proceso en la cutícula de las hojas de cítricos, pero de suceder, la cutícula más espesa y menos permeable de 'Okitsu' constituiría una ventaja para la resistencia.

En este trabajo de Tesis se demuestra que las características de la cutícula de las hojas de cítricos influyen en la colonización bacteriana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en mutantes de otras especies vegetales (Li *et al.*, 2007; Marcell & Beattie, 2002; Tang *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2004). En maíz, plantas mutantes que presentan alterada la biosíntesis de ceras en sus hojas juveniles, y que por lo tanto muestran menores niveles de ceras, son más susceptibles a la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. En esta interacción específica, el menor espesor cuticular permite una mayor difusión de nutrientes a través de la cutícula y una mayor acumulación de agua que favorece el crecimiento bacteriano (Marcell & Beattie, 2002). Por otro lado, Tang *et al.* (2007) caracterizaron una mutante de *Arabidopsis* en el gen *SMA4*, que muestra una alta susceptibilidad a la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Esta cepa

normalmente produce una HR en el genotipo salvaje de *Arabidopsis*. El gen *SMA4* fue identificado y se comprobó que codifica para una acil-CoA sintetasa de cadena larga (LACS2) previamente identificada, que participa en la biosíntesis de cutina (Schnurr *et al.*, 2004). La mutante *lacs2* muestra claros defectos cuticulares, incluyendo un rápido flujo de clorofila de las hojas en etanol y una cutícula aproximadamente 1,6 veces más fina que la salvaje.

4.II.3.2. Las características morfológicas de los estomas del cv 'Okitsu' reducen el ingreso de *X. citri*

Los apéndices cuticulares de las células oclusivas de los estomas son una característica conservada de casi todas las especies de dicotiledóneas y se considera que cumplen un rol crítico impidiendo el ingreso de agua a las cámaras subestomáticas (Li *et al.*, 2007). En este trabajo de Tesis se demostró que el espesor de las antecámaras de los estomas, formadas por prolongaciones cuticulares, es un 72% mayor en 'Okitsu' que en 'Clemenules' (**Figura 4.II.3**). Estos resultados se correlacionan con los estudios de permeabilidad, en los cuales se demuestra que a tiempos tempranos los estomas de hojas de 'Clemenules' de 18 días edad son más permeables que los de 'Okitsu' (**Figura 4.II.5**). La cutícula más gruesa en el cv. 'Okitsu' podría reducir el ingreso de *X. citri* a través de los estomas, debido a que la capa cuticular forma una cubierta alrededor de las células oclusivas, creando una antecámara sobre el poro estomático (Graham *et al.*, 1992b). En *Arabidopsis*, la mutante en los genes *GPAT4/GPAT8* presenta un contenido reducido de cutina y los rebordes cuticulares que recubren las células oclusivas de los estomas están ausentes. Esta mutante es más susceptible al ataque del hongo *Alternaria brassicicola*, lo cual remarca la importancia de la cutina en la biología de estas aberturas naturales (Li *et al.*, 2007).

Por otro lado, en este Trabajo de Tesis también se ha demostrado que en hojas de 18 días de edad, los estomas de 'Okitsu' presentan una menor apertura estomática que los de 'Clemenules', independientemente del tratamiento al cual son sometidos y del tiempo

post-tratamiento (**Figura 4.II.1**). Esta menor apertura estomática también podría deberse al mayor espesor de las prolongaciones cuticulares de las células oclusivas en el cultivar resistente. Los estomas deben responder a un número de estímulos, como luz, humedad, concentración de CO₂, microorganismos y el reloj circadiano. La manera en la cual estos factores son priorizados en el campo por las células oclusivas y los mecanismos de priorización son desconocidos. Por ejemplo, ante condiciones de grandes precipitaciones y tormentas, la defensa estomática puede estar comprometida porque la humedad inhibe el cierre estomático, permitiendo el ingreso de mayor cantidad de bacteria (Melotto *et al.*, 2008). En esta situación, un factor favorable que contribuiría a la resistencia en 'Okitsu' es la menor formación de biofilm y crecimiento epifítico de *X. citri* en la superficie de sus hojas (**Figura 4.I.4**), consecuencia de lo cual no habría cantidad significativa de bacteria para ingresar por los estomas e iniciar la infección.

4.II.3.3. *X. citri* no induce cambios estructurales en las células del mesófilo de 'Okitsu'

Al inocular hojas de 18 días de ambos cultivares con *X. citri*, la morfología y ultraestructura de las células foliares de 'Okitsu' se mantuvo íntegra, y no se observaron bacterias, independientemente del momento de observación (**Figura 4.II.6**). En cambio, en 'Clemenules' se produjeron alteraciones estructurales que fueron más notables a medida que avanzaron los días desde la inoculación (**Figura 4.II.7**). La escasa colonización por parte de *X. citri* de los tejidos de 'Clemenules' a los 6 dpi podría deberse a que una vez que llega a la superficie de la hoja *X. citri* presenta una fase de crecimiento epifítico y formación de biofilm antes de penetrar por los estomas. Como ha sido demostrado en el Capítulo I, *X. citri* consigue formar un biofilm estructurado a 7 dpi en el cv. 'Clemenules', momento a partir del cual ingresaría al mesófilo de las hojas (**Figura 4.I.4**). Finalmente, a los 26 dpi, *X. citri* se multiplicó y dispersó extensivamente en los espacios intercelulares de las hojas provocando colapso celular, hiperplasia e hipertrofia en 'Clemenules' pero no en 'Okitsu' (**Figura 4.II.6 y 7**).

El material fibrilar, electro-denso proveniente de la degradación de paredes celulares y el colapso celular encontrado en 'Clemenules' es típico de las interacciones compatibles, como la descrita para *X. citri* y lima mexicana, muy susceptible a esta bacteria (Lee *et al.*, 2009). Al contrario, es importante destacar, que en ninguno de los estadios analizados de 'Okitsu' se observó la respuesta típica de los cultivares que muestran diferentes grados de resistencia del mesófilo a *X. citri*, como por ejemplo protuberancias o aposiciones en la pared celular para ocluir los espacios intercelulares, formación de papilas cercanas a las bacterias, e inmovilización de bacterias (Dienelt & Lawson, 1989; Koizumi, 1979; Lee *et al.*, 2009). Estos resultados confirman que la inoculación de *X. citri* no induce ningún mecanismo de defensa estructural en el mesófilo de 'Okitsu', y que la cutícula, como barrera de defensa primaria, impide o restringe el ingreso de la bacteria. El estudio de la dinámica temporal y espacial de la formación de una barrera estructural como es la cutícula a partir de los resultados de microscopía presentados, en conjunto con los estudios de patogenicidad de la bacteria realizados en distintos estadios de desarrollo de las hojas, sugiere que en 'Okitsu' la cutícula constituye una barrera de defensa preformada, que impide el ingreso de *X. citri* al mesófilo.

4.II.3.4. Modelo de resistencia a *X. citri* en las hojas de Okitsu

En base a los resultados presentados se propone un modelo que resume las causas de la resistencia a *X. citri* en el cv. 'Okitsu' (**Figura 4.II.8**).

i) *X. citri* llega a las hojas dispersada por la lluvia y el viento, y las bacterias se distribuyen al azar sobre la superficie cuticular.

ii) Las bacterias deben adherirse y modificar su ambiente a través de la producción de exopolisacáridos para sobrevivir. Las bacterias más exitosas son las que se adhieren en las uniones de las células epidérmicas, más pronunciadas en 'Clemenules'; o bien alrededor de los estomas, que presentan una mayor apertura en 'Clemenules'. Un número reducido de bacterias llega directamente a los estomas y penetra directamente, estas serían las causantes de los pocos canchales que se producen en 'Okitsu'.

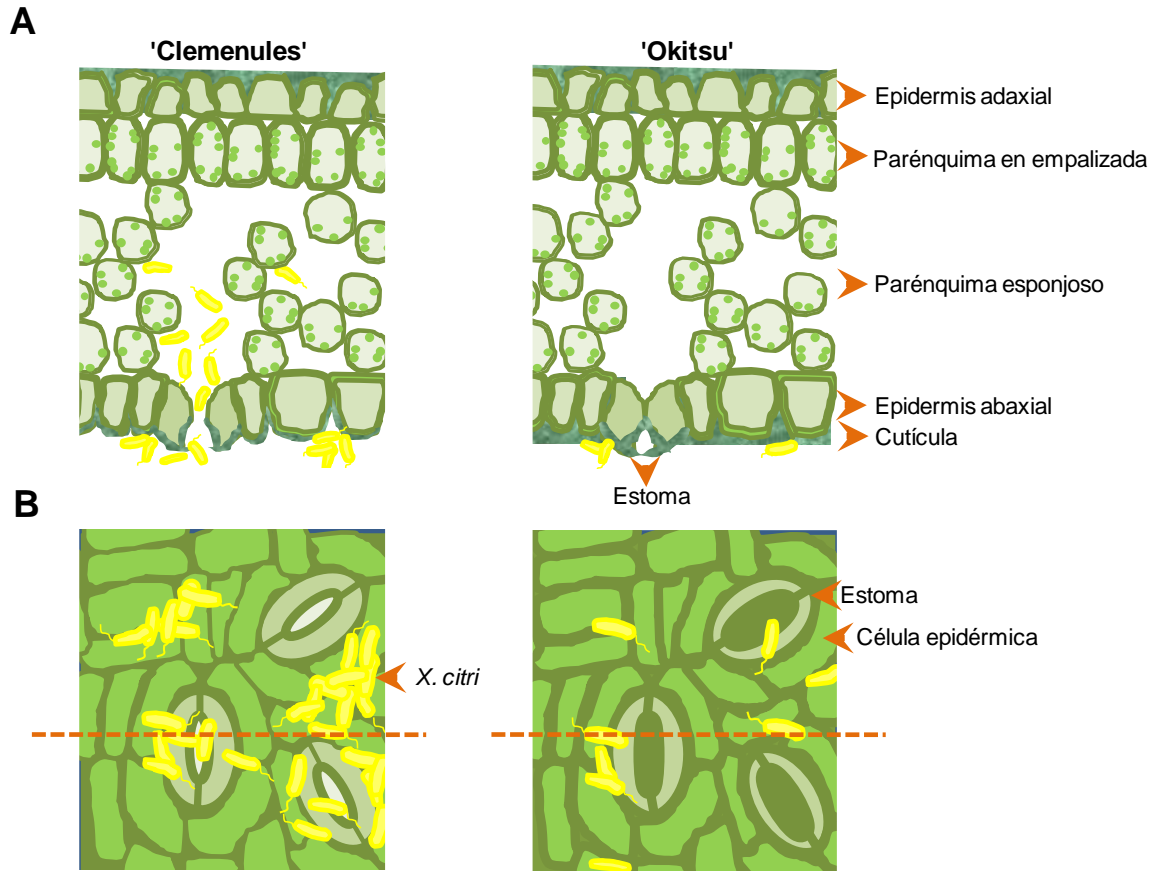


Figura 4.II.8. Modelo de las causas de la resistencia a *X. citri* en hojas de 18 días del cv. 'Okitsu'. A- Corte transversal hojas de los cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu', en la zona delimitada con la línea de puntos mostrada en B. Se destacan las principales diferencias entre los cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu' en el espesor cuticular, las depresiones que se forman entre las uniones de las células, la apertura y cobertura cuticular de los estomas y la formación de biofilm e ingreso bacteriano al mesófilo. B- Vista superficial de la epidermis abaxial de hojas de los cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu', en las cuales se visualizan las diferencias en la apertura estomática y la formación de biofilm.

iii) Las bacterias se dividen, crecen epifíticamente y comienzan a formar biofilms, lo cual incrementa su supervivencia. Las bacterias que no se ubican en lugares protegidos tienen menores posibilidades de supervivencia. En 'Okitsu' existirían menor cantidad de estos sitios protegidos.

iv) La formación de biofilm produce microcolonias de *X. citri*, que se desarrollan formando agregados bacterianos.

v) Las colonias numerosas de *X. citri*, que se desarrollan en mayor medida en 'Clemenules', tienen más posibilidades de arribar a la cercanía de un estoma y penetrar hacia el interior de los tejidos.

vi) A partir de su ingreso, *X. citri* se multiplica en los espacios intercelulares de 'Clemenules' produciendo la hiperplasia e hipertrofia que da lugar a la formación de canchros. El ingreso al mesófilo no ocurriría en las hojas de 'Okitsu'.

vii) Cuando los canchros se tornan erumpentes, *X. citri* es exudada hacia la superficie de las hojas y es dispersada por la lluvia y viento reiniciando el ciclo.

En conclusión, la resistencia en 'Okitsu' se basa en la combinación de varios mecanismos de defensa: un desarrollo más rápido de la cutícula; superficie cuticular lisa, sin depresiones que generen sitios protegidos para la bacteria; y menor apertura estomática, a causa de los rebordes cuticulares. Un aspecto de gran importancia para el desarrollo de cultivares resistentes a canchrosis sería determinar cuáles son los genes que se inducen diferencialmente en la epidermis para que la cutícula se desarrolle más rápido en 'Okitsu'.

Capítulo III

Análisis de la expresión diferencial de genes asociados a síntesis de cutícula entre 'Okitsu' y 'Clemenules' y su relación con el desarrollo del cancro bacteriano

4.III.1. Resumen

La resistencia en las hojas jóvenes de 'Okitsu' se basa en la combinación de varios mecanismos de defensa: un desarrollo más rápido de la cutícula; superficie cuticular lisa, sin depresiones que generen sitios protegidos para la bacteria; y menor apertura estomática, a causa de los rebordes cuticulares.

Un mayor entendimiento de las vías de biosíntesis de cutícula en cítricos y específicamente de los genes que se inducen significativamente en 'Okitsu' con respecto a 'Clemenules' permitirá establecer genes candidatos para el mejoramiento de cultivares de cítricos para que sean resistentes a cancrrosis. Por ello, en el presente Capítulo de Resultados se planteó el siguiente objetivo: i) Estudiar la expresión de genes clave en la biosíntesis de cutícula que podrían contribuir a la resistencia a cancrrosis en el cv. 'Okitsu'.

4.III.2. Resultados

4.III.2.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes involucrados en la biosíntesis de cutina y ceras cuticulares en los cultivares 'Okitsu' y 'Clemenules'

El análisis de la expresión de los principales genes involucrados en las rutas biosintéticas de la cutícula no sólo provee información acerca de la biogénesis de la cutícula en cítricos, sino que también permite determinar el tiempo específico de la deposición de cutina y ceras en cada uno de los estadios de desarrollo de la hoja de mandarina. Debido a que las características específicas de la cutícula son fuertemente dependientes de la eco-fisiología de la planta (Javelle *et al.*, 2011), trabajar en diferentes especies de plantas es importante para un entendimiento integrador del rol protector de la capa más externa del reino vegetal.

4.III.2.1.1. Análisis de la expresión diferencial de genes a nivel celular, a través de microdissección de la epidermis de mandarina

La microdissección láser permite la captura de las células de interés (Inada & Wildermuth, 2005; Kerk *et al.*, 2003), permitiendo enriquecer las muestras con transcritos específicos. Para conocer cuáles son los genes relacionados a la biosíntesis de cutícula que se expresan diferencialmente entre ambos cultivares de mandarina, se propuso microdisseccionar epidermis de hojas de ambos cultivares de mandarina sin inocular, debido a que en este tejido se expresan específicamente los genes que participan en la biosíntesis de cutícula.

Para microdisseccionar las células de interés, los tejidos se colocan en fijadores para conservar la estructura celular, luego se embeben en parafina y por último se cortan las secciones. A partir de éstas, se diseccionan las células blanco y finalmente se les extrae el ARN para el análisis de la expresión génica (Schnable *et al.*, 2004).

4.III.2.1.1.1. Optimización de un protocolo de preparación de tacos de parafina que permita la posterior extracción de ARN de calidad

Con el objetivo de estudiar el rol pasivo de la cutícula de los cultivares de mandarina en la defensa contra *X. citri*, se tomaron muestras de hojas de 18 días de edad sin inocular. La preparación de tejidos para microdissección laser requiere de un balance entre la preservación de la estructura celular y el rendimiento e integridad del ARN (Kerk *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2006). El procesado de las muestras debe ser ajustado para asegurar que las células blanco puedan ser identificadas y distinguidas de las demás y que el ARN preserve sus propiedades (Nelson *et al.*, 2006). Los fijadores como el FAA proveen mayor detalle histológico a expensas de una disminución en la extracción e integridad del ARN (Kerk *et al.*, 2007). Algunos fijadores para tejidos de plantas que permiten alcanzar un buen balance entre preservación de morfología y extracción de ARN son el etanol-ácido acético y methacarn (Nelson *et al.*, 2006).

En este trabajo de Tesis se utilizaron inicialmente tres fijadores distintos: FAA, etanol-ácido acético y methacarn. Luego de la fijación, se realizó una extracción de ARN con TRIzol y se comprobó que los dos primeros fijadores no permitieron una buena preservación de la calidad del ARN (**Figura 4.III.1**). Por otro lado, el methacarn permitió una excelente conservación tanto de la morfología celular como de la calidad del ARN, que se mantuvo luego de la deshidratación e imbibición en parafina de las muestras (**Figura 4.III.1**). A partir de estos resultados se continuaron los experimentos utilizando muestras fijadas en methacarn.

Otro aspecto crítico en la conservación de la calidad del ARN es la reducción al mínimo de los tiempos de deshidratación y parafinado (Takahashi *et al.*, 2010). En este sentido, los tiempos utilizados para la preparación convencional de bloques de parafina (**Sección 3.12.2**) se acortaron notablemente, reduciendo la deshidratación de 18 a 11 h y la imbibición en parafina de 24 a 18 h.

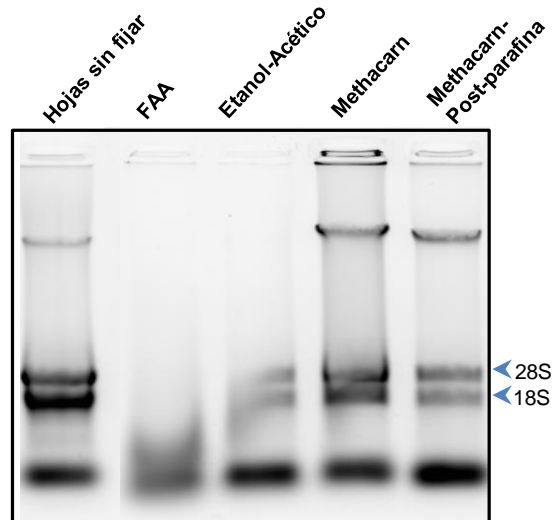


Figura 4.III.1. Integridad del ARN total obtenido de hojas de mandarina luego de la fijación en diferentes soluciones y de la imbibición en parafina. ARN total (3 ul) de muestras formadas por trozos de hojas de ambos cultivares de mandarina, 'Clemenules' y 'Okitsu', separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y teñidos con bromuro de etidio. Como control se le extrajo el ARN a una muestra de trozos de hojas frescas, sin fijar, de ambos cultivares de mandarina.

4.III.2.1.1.2. Microdissección de epidermis abaxial

A partir de los bloques de parafina obtenidos, se cortaron secciones transversales seriadas de las hojas. Los bloques que mostraron una adecuada integridad de los tejidos y la epidermis al ser observados al microscopio fueron seleccionados para la microdissección. Las secciones se ubicaron con metanol sobre portaobjetos de aluminio con membrana de polietileno, se desparafinaron y se dejaron secar bajo campana. El uso del metanol en lugar de agua DEPC durante el montaje de las secciones se recomienda dado que el agua activa las enzimas RNAsas. Inmediatamente, se procedió a la microdissección de las células epidérmicas utilizando un microdisector láser (**Figura 4.III.2 A**). En este equipo, se coloca en una platina el portaobjetos con la membrana de polietileno, y las secciones de hojas ubicadas por debajo de la misma (**Figura 4.III.2 B y C**). El área cortada es succionada automáticamente en la tapa del microtubo ubicado debajo del portaobjetos (**Figura 4.III.2 C**).

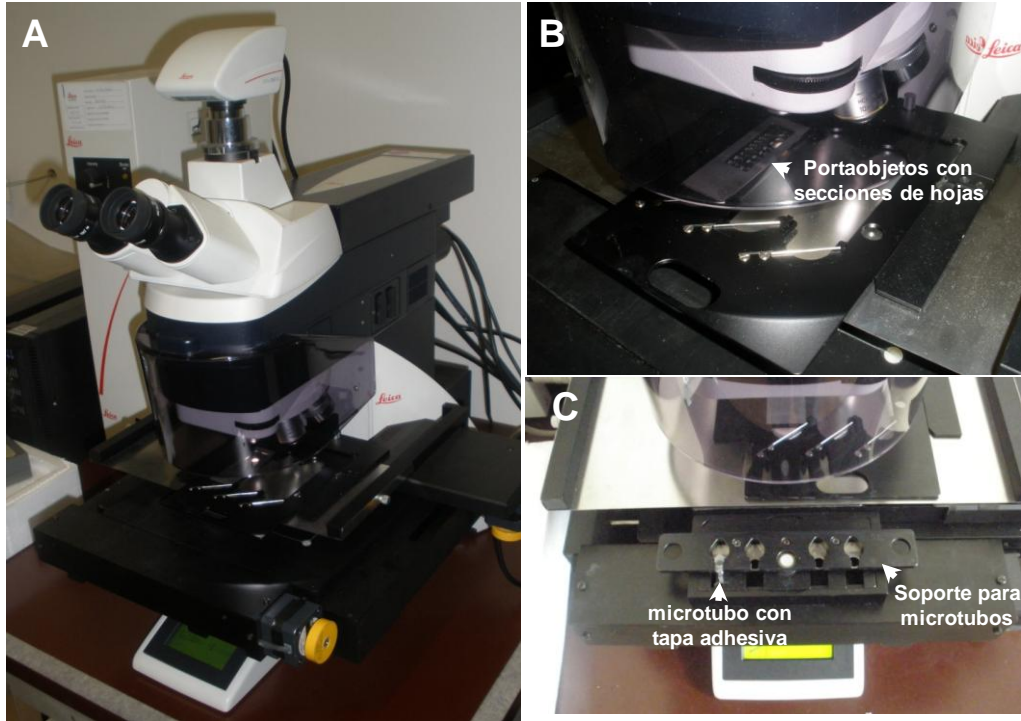


Figura 4.III.2. Equipamiento utilizado para la microdissección de epidermis abaxial de hojas. A- Microdisector Laser Leica LMD6000, utilizado para realizar las disecciones de epidermis. B- Las secciones de hojas a microdisecar se ubican por debajo de la membrana de polietileno en el portaobjetos especial de aluminio. C- El área cortada es succionada automáticamente por la tapa adhesiva del microtubo, que se coloca en un soporte ubicado debajo del portaobjetos.

El programa del equipo permite realizar un escaneo completo del portaobjetos de aluminio (Figura 4.III.3 A) con baja magnificación (4 X) para facilitar el desplazamiento posterior a lo largo de las muestras (Figura 4.III.3 B). Posteriormente, se elige el objetivo de 20X, se delimita el área a cortar con el láser (Figura 4.III.3 C) y se disecciona (Figura 4.III.3 D). En este caso se optó por cortar la capa de células epidérmicas y una capa de células subepidérmicas, considerando que el láser al cortar ocasiona daño en el tejido. Paralelamente a la disección, el programa va registrando el área de tejido colectada. A partir de cada bloque de parafina se seccionaron aproximadamente 40.000 células epidérmicas, equivalentes a 8.000.000 de μm^2 de área de corte.

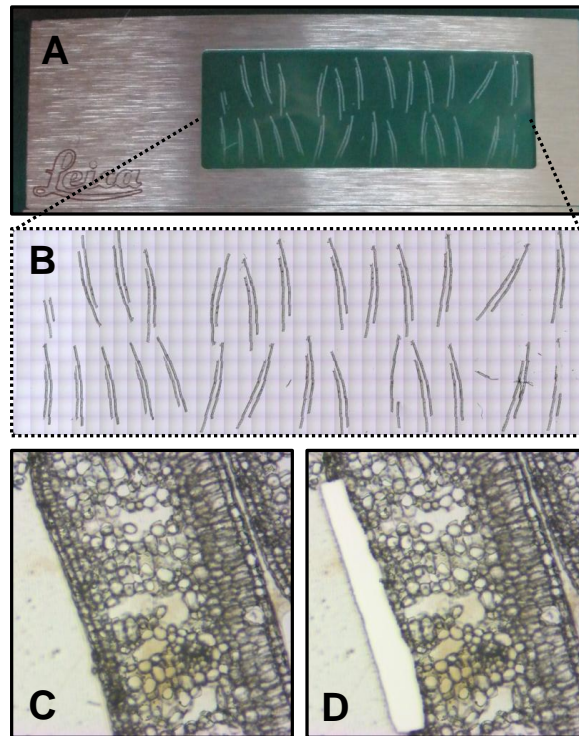


Figura 4.III.3. Microdissección de epidermis abaxial de hojas. A- Portaobjetos especial para microdissección con las secciones de hojas dispuestas en su cara inferior. B- Escaneo completo del portaobjetos en baja magnificación, realizado con la ayuda del programa. C- Corte transversal de hoja antes de la disección de la epidermis (Magnificación 20X). D- Corte transversal de hoja luego de la microdissección de la epidermis (Magnificación 20X).

4.III.2.1.1.3. Extracción de ARN a partir del tejido microdisseccionado

Luego de la colección de las células se realizó la extracción de ARN con el kit Arcturus PicoPure RNA Isolation (Applied Biosystems, EE.UU.). La calidad del ARN obtenido se analizó por electroforesis capilar en un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc., EE.UU.), utilizando el kit RNA 6.000 Pico LabChip (Agilent, EE.UU.). Este kit puede analizar concentraciones de ARN de 50-5000 pg/ μ l, cantidad imposible de analizar en un espectrofotómetro tradicional. El programa del bioanalizador genera un electroferograma, una imagen computarizada que simula un gel, y determina la concentración y la relación ribosomal 18S-28S de los ARN evaluados. El electroferograma provee un detalle visual de la calidad de una muestra de ARN y muestra la distribución por tamaño de los fragmentos de ARN. A medida que aumenta la degradación del ARN

hay un decrecimiento en las bandas de ARN ribosomales 18S-28S y un incremento en la señal anterior a los dos picos ribosomales (**Figura 4.III.4**). Teniendo en cuenta todos estos parámetros, este equipo determina el número de integridad del ARN, RIN (del inglés *RNA integrity number*). El ARN se clasifica de acuerdo a su integridad mediante el RIN de 1 a 10. Un RIN de 1 indica un ARN totalmente degradado, mientras que un RIN de 10 indica un ARN intacto (**Figura 4.III.4**).

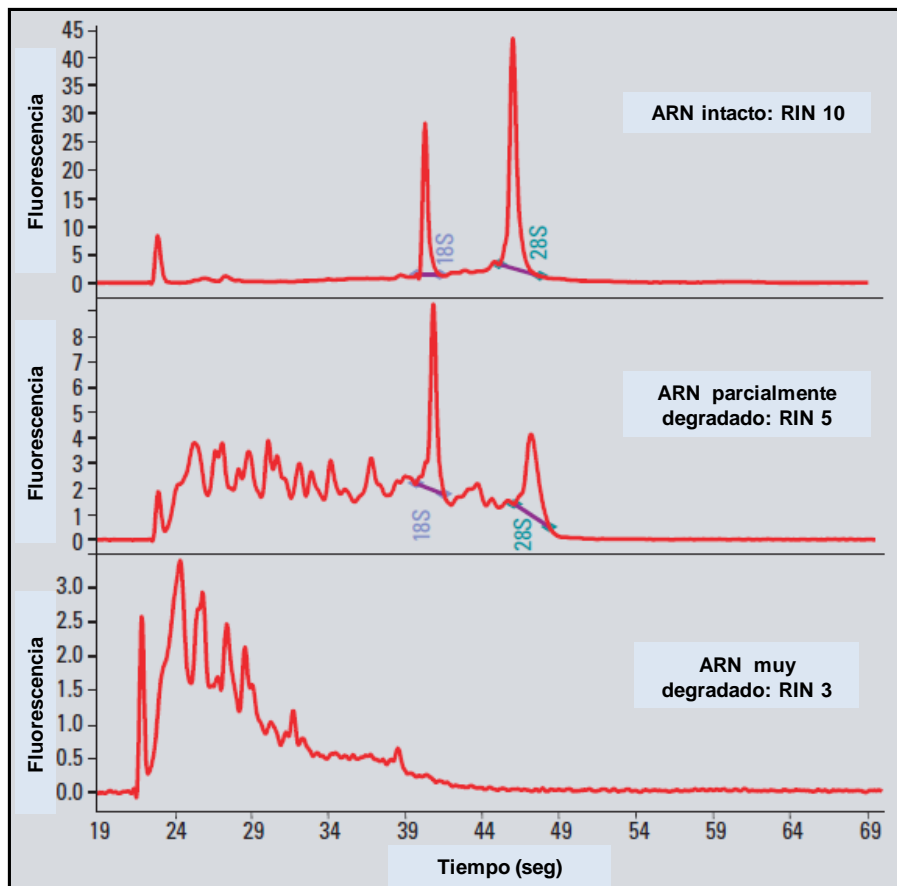


Figura 4.III.4. Electroferogramas generados en el Bionalizador Agilent 2100 para ARN de distinta calidad e integridad. A medida que aumenta la degradación del ARN el RIN disminuye, hay un decrecimiento en las bandas de ARN ribosomales 18S-28S y un incremento en la señal anterior a los dos picos ribosomales. Tomado de Mueller *et al.* (2004).

Para obtener un seguimiento completo, no sólo se evaluó el RIN de las muestras microdisccionadas, sino también el de las muestras de ARN extraído luego de la

deshidratación en etanol y de la imbibición en parafina. En la **Figura 4.III.5** se muestran los resultados obtenidos para una muestra formada por submuestras de tejido sin inocular de 'Clemenules' y 'Okitsu'. Si bien la calidad e integridad del ARN de las muestras post deshidratación con etanol fue buena, y alcanzó un RIN de 7,8, la integridad bajó notablemente luego de la imbibición en parafina (RIN 5,3), y la microdissección disminuyó aún más este parámetro (RIN 3).

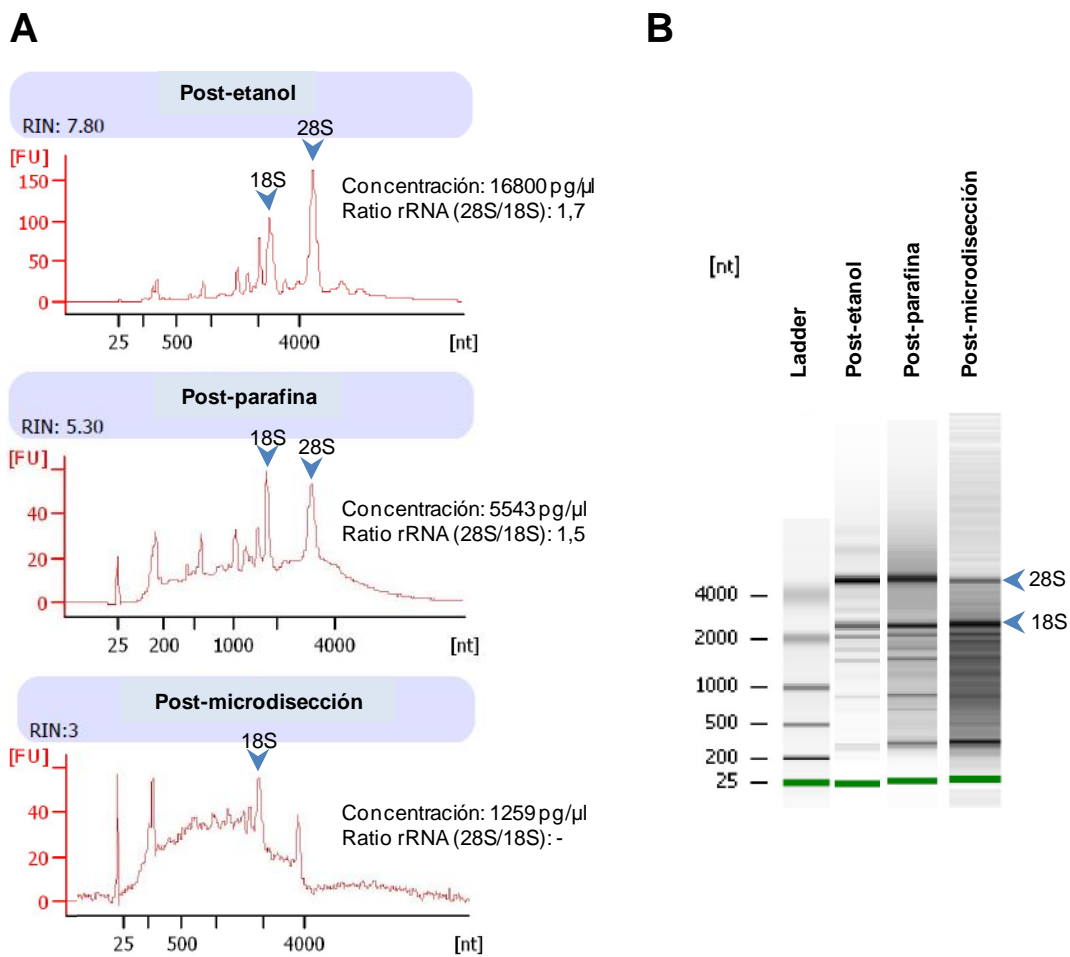


Figura 4.III.5. A- Electroferogramas generados a partir de ARN extraídos en distintos pasos del procesamiento de las muestras para microdissección. En el eje x se muestran los tamaños de los fragmentos de ARN en nucleótidos (nt). En el eje y se observan las unidades de fluorescencia (FU), una medida arbitraria de la concentración de ARN. Las flechas azules señalan las bandas de ARN ribosomales de 18 y 28S. Se detallan la concentración del ARN y la relación de los ARN ribosomales (28S/18S). B- Imagen computarizada similar a un gel, generada por el bioanalizador para las diferentes muestras analizadas. Puede observarse como a medida que disminuye la integridad del

ARN de las muestras, aumentan las bandas de menor tamaño. L: ladder de ARN con bandas de diferente cantidad de nucleótidos (nt).

Debido a que la cantidad de ARN obtenida a partir de tejidos microdisecionados es muy baja, las aplicaciones posteriores que permiten analizar la expresión de genes como PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) o secuenciación del ARN (RNA-seq) requieren realizar una o dos amplificaciones de los ácidos nucleicos para obtener cantidad suficiente. En líneas generales los kits de amplificación requieren de una cantidad de ARN de 500 pg a 50 ng para producir una cantidad de 10 a 30 μ g de ARN amplificado. Los requisitos que debe cumplir el ARN extraído del tejido microdisecionado son muy exigentes, dado que los kits de amplificación son muy costosos. Un ARN con un RIN inferior a 6,5-7 produce resultados de amplificación subóptimos. El objetivo inicial que se persiguió al realizar la microdiseción fue analizar el transcriptoma completo de la epidermis de ambos cultivares de mandarino a través de RNA-seq o microarreglos de cítricos (Agilent Technologies Inc, Palo alto, CA). Lamentablemente, a pesar de que la cantidad de ARN obtenida era suficiente para realizar una amplificación, las muestras obtenidas luego de la microdiseción alcanzaron un RIN de 3, por lo cual se decidió no continuar con el experimento.

De los resultados presentados en la **Figura 4.III.5** puede concluirse que la deshidratación de los tejidos no afectó la integridad del ARN. Sin embargo, la imbibición en parafina disminuyó notablemente el RIN, y el proceso de microdiseción profundizó aún más la degradación del ARN. A pesar de haberse reducido al mínimo las horas de imbibición en parafina, y de haberse tomado las precauciones necesarias durante la microdiseción para evitar la actividad de enzimas ARNasas que degradan el ARN, los resultados no fueron los esperados. A pesar de ello, debido a que las variaciones en expresión de genes atribuibles a tipos celulares específicos como las células epidérmicas propiamente dichas o células oclusivas pueden ser cruciales en cuanto sus funciones biológicas en la cutícula, debería insistirse en estudiar la expresión de genes a un nivel celular a través de la microdiseción.

4.III.2.1.2. Análisis de la expresión diferencial de genes en hojas de mandarina a través de qRT-PCR

La información disponible de las vías de biosíntesis de cutícula en *Arabidopsis* permitió la selección de genes clave a analizar (Tabla 4.III.1). A partir de la secuencia proteica de los genes de *Arabidopsis*, se eligieron en la base de datos del genoma de *C. clementina* disponible en el sitio Phytozome (www.phytozome.net; Goodstein *et al.*, 2012) las secuencias proteicas con mayor % de identidad. Cabe destacar que la secuencia de *C. unshiu* no ha sido publicada aún, por lo cual se utilizaron los mismos cebadores para ambas especies en estudio. Notablemente, todos los genes elegidos de *Arabidopsis* presentaron un ortólogo en *Citrus clementina* con una anotación funcional putativa similar, lo cual podría implicar que las vías de biosíntesis son conservadas entre ambas especies (Tabla 4.III.1). Para confirmar la anotación funcional de los genes seleccionados de *Citrus clementina* se utilizó la herramienta BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) realizando una comparación con toda las bases de datos de especies vegetales disponibles.

Para cada uno de los genes seleccionados se diseñaron cebadores con el programa Primer 3 v 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>; Untergrasser *et al.*, 2012). Por otro lado, la secuencia de los cebadores GDSL, ATP y CER3, se tomó de un estudio en el cual se analizó la expresión de genes en epidermis en comparación con su expresión en tejidos subepidérmicos de frutos de *C. clementina*. Los genes amplificados por estos cebadores predominaron en tejidos epidérmicos (Matas *et al.*, 2010).

A fin de determinar cuáles son los genes implicados en el mayor espesor cuticular de las hojas de 18 días de edad de 'Okitsu', se analizó en hojas de mandarinos de diferentes estados fenológicos, la expresión estos genes clave involucrados en las vías de biosíntesis, transporte y regulación de ceras y cutina de *Arabidopsis*. Para ello, se utilizó ARN extraído de tejido total de hoja. No obstante, debido a que la mayoría de los genes estudiados se expresan específicamente en las células epidérmicas, se considera que los niveles de transcriptos encontrados son exclusivos de este tejido.

Tabla 4.III.1. Genes involucrados en la biosíntesis de cutícula en *Arabidopsis* y su ortólogo con mayor porcentaje de identidad en *C. clementina*

Gen	Descripción	Base de datos <i>Arabidopsis</i> ^a	Base de datos <i>C. clementina</i> ^b	% de Identidad ^c
<i>CER1</i> Eceriferum 1	Reductasa putativa de VLC-Acil-CoAs, involucrada en la síntesis de alcanos	At1g02205	Ciclev10019279m	64
<i>CER3</i> Eceriferum 1	Aldehído descarboxilasa putativa, involucrada en la síntesis de alcanos y aldehídos	-	-	-
<i>CER4</i> Eceriferum 4	Acil-CoA reductasa involucrada en la formación de alcoholes primarios	At4g33790	Ciclev10028507m	54
<i>CER6</i> Eceriferum 6	β -cetoacil-CoA sintasa, integrante del complejo FAE que sintetiza los VLCFAs	At1g68530	Ciclev10031329m	85
<i>CER7</i> Eceriferum 7	Exoribonucleasa exosomal, que regula transcripcionalmente a CER3	At3g60500	Ciclev10015159m	61
<i>MAH1</i> Hidroxilasa de alcanos	Citocromo P450 de la subfamilia CYP96A, implicada en la formación de alcoholes secundarios y cetonas	At1g57750	Ciclev10025412m	47
<i>WSDL</i> Sintasa de ceras	Sintasa de ceras involucrada en la formación de ésteres	At5g37300	Ciclev10019854m	48
<i>LACS1</i> Sintetasa de ácidos grasos de cadena larga	Sintetasa de ácidos grasos de cadena larga involucrada en la síntesis de cutina	At2g47240	Ciclev10019205m	68
<i>LACS2</i> Sintetasa de ácidos grasos de cadena larga	Sintetasa de ácidos grasos de cadena larga involucrada en la síntesis de cutina	At1g49430	Ciclev10027967m	68

<i>CYP86A</i> Oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450	Oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450 de la subfamilia CYP86A involucrada en la síntesis de cutina	At4g00360	Ciclev10019633m	77
<i>GPAT4</i> Glicerol-3-fosfato acil-CoA aciltransferasa 4	Glicerol-3-fosfato acil-CoA aciltransferasa involucrada en la síntesis de cutina	At1g01610	Ciclev10019825m.g	78
<i>GDSL</i> Lipasa de la familia GDSL	Poliéster sintasa responsable de la polimerización de los ácidos grasos que forman la cutina	-	-	-
<i>MYB30</i> Proteína con Dominio MYB30	Factor de transcripción MYB30, activa a los genes del complejo <i>FAE</i> , <i>CER2</i> , <i>CER3</i> y <i>CYP86A2</i> , entre otros genes	At3g28910	Ciclev10012152m	52
<i>WIN1</i> Inductor de ceras 1	Factor de transcripción inductor de ceras, induce a <i>LACS2</i> , <i>GPAT4</i> y <i>CER1</i> , entre otros genes	At1g15360	Ciclev10027305m	65
<i>ABC</i> Transportador ABC dependiente de ATP	Transportador ABC que exporta las ceras desde la membrana plasmática a la pared celular	-	-	-

^a Base de datos de *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org>)

^b Base de datos de *C. clementina* (<http://www.phytozome.net>)

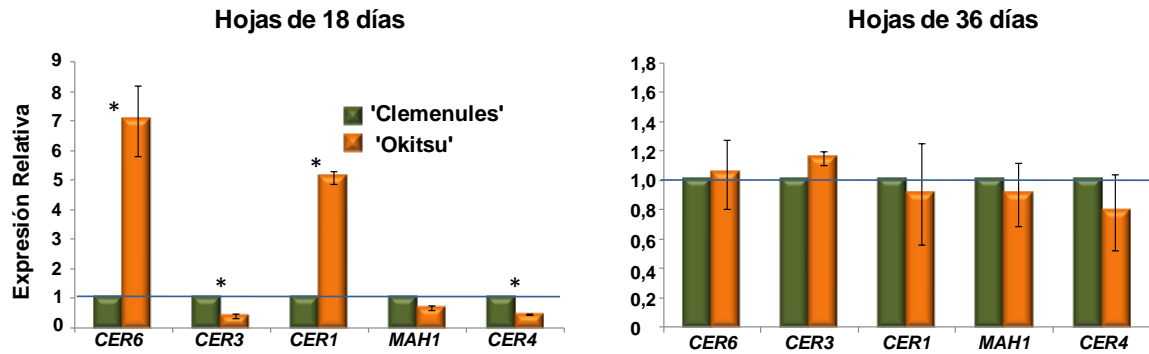
^c % de Identidad proteica entre *Arabidopsis* y *C. clementina*

La amplificación por qRT-PCR permitió identificar cuáles de los genes seleccionados se expresan diferencialmente entre ambos cultivares de mandarina en hojas de 18 días de edad (**Figura 4.III.6**). Entre los genes involucrados en la biosíntesis de ceras, la epidermis de las hojas de 'Okitsu' mostró una inducción en *CER6* de 7 veces respecto a 'Clemenules'. Los VLCFAs generados por el complejo FAE, con la participación de *CER6*, se derivan

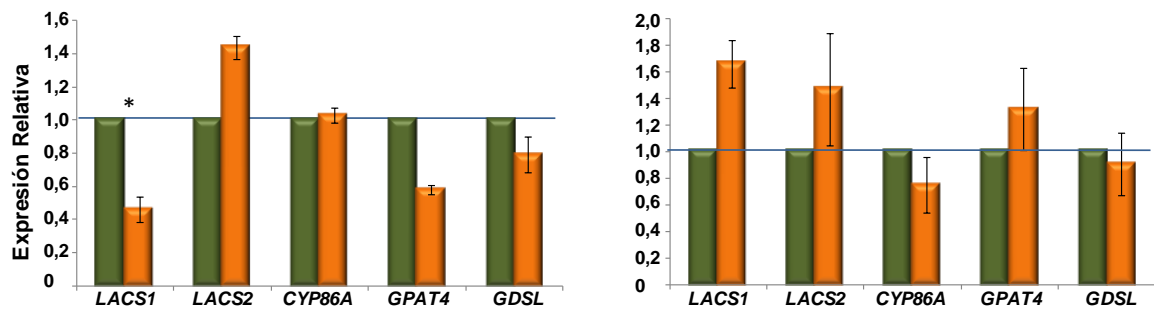
posteriormente hacia las vías de producción de ceras. Entre ellas, la descarboxilación da lugar a la producción de alcanos, con la intervención de los genes *CER1* y *CER3* (**Figura 4.III.6**). Particularmente, los niveles de transcritos de *CER1* en 'Okitsu' fueron 5 veces superiores a los de 'Clemenules'; mientras que por el contrario, *CER3* mostró una expresión relativa de 0,41, equivalente a niveles de transcritos 2,5 veces inferiores en el cultivar resistente. Otra vía que pueden seguir los VLCFAs es la formación de ácidos grasos libres, a partir de la participación del gen *LACS1* y la formación de alcoholes primarios a través de la intervención de *CER4* (**Figura 4.III.6**). Estos genes presentaron una expresión relativa de 0,46 en las células epidérmicas de 'Okitsu', es decir 2,2 veces menos que 'Clemenules'. Por otro lado, el gen *MAH1*, que cataliza la producción de alcoholes secundarios y cetonas, no mostró patrones de expresión diferencial entre cultivares (**Figura 4.III.6**). Notablemente, a excepción de *LACS1*, que también participa de la biosíntesis de ceras, ninguno de los genes analizados involucrados en la biosíntesis de cutina mostró expresión diferencial entre cultivares en la epidermis de hojas de 18 días de edad. Por otro lado, entre los factores de transcripción que regulan la biosíntesis de cutícula, *WIN1* se indujo 2,6 veces en 'Okitsu' con respecto a 'Clemenules', mientras que *CER7* presentó una expresión relativa de 0,28 (-3,5 veces) (**Figura 4.III.6**). Resulta importante destacar que los genes *WSDL* y *MYB30* no pudieron ser amplificados exitosamente, y por lo tanto no fueron incluidos en este análisis.

A diferencia de lo que ocurrió en la epidermis de hojas de 18 días de edad, ninguno de los genes involucrados en la biosíntesis de ceras o cutina se expresó diferencialmente entre ambos cultivares en las hojas de 36 días de edad. Sin embargo, el transportador ABC dependiente de ATP, mostró una expresión relativa de 0,28 en 'Okitsu' respecto a 'Clemenules' (-4 veces) (**Figura 4.III.6**). Independientemente del cultivar analizado, los niveles de transcritos en hojas de 36 días fueron inferiores o similares que en hojas de 18 días de edad para todos los genes analizados (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la regulación de la biosíntesis de cutícula varía de acuerdo al estado fenológico y que una vez que la hoja se ha expandido completamente, no se agregan más componentes a la cutícula (Jeffree, 1996).

Biosíntesis de Ceras



Biosíntesis de Cutina



Transporte y Regulación

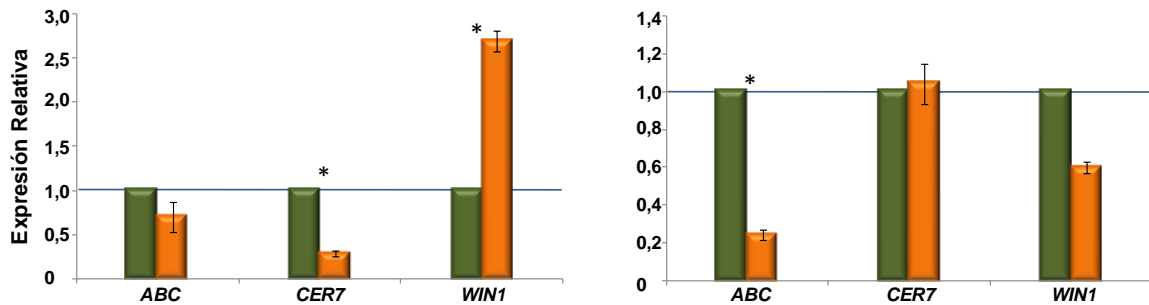


Figura 4.III.6. Análisis de la expresión de genes de biosíntesis de cutícula en diferentes estados de desarrollo de hojas de mandarino por qRT-PCR. La expresión de los genes en 'Okitsu' fue relativizada con respecto a 'Clemenules', por lo cual se señala con la línea horizontal azul el valor de 1 para todos los genes en este cultivar. La expresión relativa se considera significativa si supera las dos veces de inducción o represión (valores umbrales de 2 y 0,5, respectivamente). Los resultados fueron normalizados mediante la expresión del ARNm que codifica para la Histona H4. La barra de error indica la desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes. *CER6*, β -cetoacil-CoA sintasa; *CER3*, eceriferum 3; *CER1*, eceriferum 1; *MAH1*, hidroxilasa de alcanos MAH1; *CER4*, acil-CoA reductasa; *LACS1* y *LACS2* sintetasa de ácidos grasos de cadena larga 1 y 2, respectivamente; *CYP86A*, oxidasa de ácidos grasos dependiente del citocromo P450 de la subfamilia CYP86A2; *GPAT4*, glicerol-3-fosfato acil-CoA aciltransferasa 4; *GDSL*, lipasa de la familia GDSL; *ABC*, transportador ABC dependiente de ATP; *CER7*, factor de transcripción ribonucleasa 7; *WIN1*, factor de transcripción inductor de ceras 1.

4.III.3. Discusión

4.III.3.1. Las propiedades físicas y químicas de la cutícula de las hojas de 'Okitsu' están involucradas en la resistencia a la cancrrosis bacteriana

La función principal de la epidermis de las plantas es formar la cutícula, una barrera funcional de la pared celular que evita la pérdida de agua excesiva y el ingreso de sustancias extrañas o patógenos al interior de la planta. Esta modificación de la pared celular está compuesta de una matriz de cutina, y de ceras, que se embeben en esta matriz y además se depositan superficialmente. Las características de la cutícula varían considerablemente entre estados de desarrollo debido a que la misma cambia y madura a medida que las hojas crecen. La cutina se forma en los estados iniciales de desarrollo de los órganos (Bird & Gray, 2003; Bernard & Joubès, 2013). La deposición de ceras continúa mientras las hojas se expanden y la cutícula se desarrolla, incrementando la cantidad de ceras y el espesor (Riederer & Schneider, 1990; Riederer & Markstädter, 1996). Una vez que la hoja se ha expandido completamente, no se agregan más componentes a la cutícula, y la misma se mantiene hasta la senescencia (Jeffree, 1996).

De acuerdo a los resultados presentados en los Capítulos I y II, la resistencia en hojas jóvenes de 'Okitsu' se basa en la combinación de varios mecanismos de defensa: un desarrollo más rápido de la cutícula; superficie cuticular lisa, sin depresiones que generen sitios protegidos para la bacteria; y menor apertura estomática, a causa de los rebordes cuticulares. Además, la cutícula de las hojas de 18 días de 'Okitsu' presenta una permeabilidad significativamente menor con respecto a la de hojas de 'Clemenules', que impide el ingreso de *X. citri* al mesófilo. Un aspecto de gran importancia para el desarrollo de cultivares resistentes a cancrrosis sería determinar cuáles son los genes que se inducen diferencialmente en la epidermis para que la cutícula se desarrolle más rápido en 'Okitsu'.

En este Capítulo se estudió la expresión de los principales genes involucrados en la biogénesis de la cutícula en mandarino. Muy poco se conoce acerca de la síntesis, transporte y regulación de los componentes de la cutícula de cítricos (Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). No obstante, los conocimientos de la biología molecular de la biogénesis de la

cutícula en *Arabidopsis* permiten la búsqueda de genes ortólogos en especies vegetales más complejas como los cítricos.

El análisis de la expresión diferencial de los principales genes involucrados en la biogénesis de cutícula en mandarino demuestra que existe una mayor producción inicial de VLCFAs en 'Okitsu' con respecto a 'Clemenules', desencadenada por la inducción de CER6 en hojas de 18 días de edad (**Figura 4.III.6 y 7**). CER6 codifica para la enzima β -cetoacil-CoA sintasa, integrante del complejo multienzimático FAE epidérmico, que produce los VLCFAs, paso inicial de la biosíntesis de ceras en las células de la epidermis (Bernard & Joubès, 2013; Haslam & Kunst, 2013; Kunst & Samuels, 2009). En *Arabidopsis*, la acumulación de ceras está regulada en gran parte por los niveles de CER6 debido a que este gen se transcribe notablemente en todos los estadios de desarrollo del tallo y hojas (Hooker *et al.*, 2002). De esta manera, altos niveles de expresión de CER6 en líneas sobreexpresantes de *Arabidopsis* resultaron en una gran acumulación de ceras, mientras que las mutantes *cer6* presentaron una reducción de todos los compuestos que conforman la misma (Bernard & Joubès, 2013; Hooker *et al.*, 2002). Si bien hasta la fecha no ha sido descrito que estas mutantes sean más susceptibles a la infección por patógenos, Garbay *et al.*, (2007) demuestran que existe una reducción significativa de la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés biótico, como las proteínas relacionadas a la patogénesis y las defensinas. Por otro lado, CER6 se induce por estrés hídrico y osmótico (Hooker *et al.*, 2002).

Los VLCFAs generados por el complejo FAE se derivan posteriormente hacia otras vías. Dentro de la vía de la descarboxilación, en 'Okitsu' ocurre una mayor activación de la producción de alcanos que en 'Clemenules' a través de la mayor inducción de CER1 y su regulador WIN1. Alternativamente, en 'Clemenules' la vía de formación de alcanos se activa significativamente a partir de la expresión de CER3 y CER7 (**Figura 4.III.6 y 7**). Al igual que lo que sucede para CER6, la expresión de CER1 y CER3 está limitada a la epidermis y se incrementa en condiciones de estrés hídrico, situación en la cual la síntesis de ceras es particularmente activa (Bourdenx *et al.*, 2011; Kosma *et al.*, 2009). Las mutantes *cer1* de *Arabidopsis* se caracterizan por una ausencia casi total de alcanos y sus derivados,

acompañada por un leve incremento en el contenido de aldehídos (Bourdenx *et al.*, 2011; Bernard *et al.*, 2012). Las mutantes *cer3* también presentan una reducción dramática en alcanos y sus derivados, pero a diferencia de las mutantes *cer1*, muestran además una reducción en la cantidad de aldehídos (Chen *et al.*, 2003). Recientemente ha sido demostrado que CER1 y CER3 constituyen los componentes centrales de un complejo multienzimático que cataliza la conversión redox-dependiente de VLCFAs a alcanos de cadena carbonada larga, tanto en levaduras como en *Arabidopsis* (Bernard *et al.*, 2012). Las isoformas del citocromo b5 (CYTB5) de *Arabidopsis* incrementan la producción de alcanos actuando específicamente como cofactores de CER1, cediendo electrones. Según el modelo propuesto por Bernard *et al.* (2012), CER3 codifica una reductasa de VLCFAs que cataliza su reducción a aldehídos; mientras que CER1 codifica una aldehído descarboxilasa que cataliza la conversión de los aldehídos hacia alcanos, con la pérdida de 1 carbono. En ausencia de su par, tanto CER1 como CER3 son capaces de conducir una débil conversión de Acil-CoAs a alcanos, lo cual explica porque los fenotipos de las mutantes *cer3* y *cer1* presentan un nivel mínimo de aldehídos y alcanos (Bourdenx *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2003). Cabe destacar que en líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *CER1*, se indujo una mayor acumulación de alcanos en las ceras que resultó en una menor permeabilidad cuticular (Bourdenx *et al.*, 2011). En este sentido, la mayor inducción de *CER1* en 'Okitsu' podría conducir a una mayor formación de alcanos en comparación con 'Clemenules'. Si bien se esperaría que una menor permeabilidad y un mayor espesor causado por una mayor cantidad de alcanos contribuyeran a la resistencia frente a patógenos, las sobreexpresantes de *Arabidopsis* en *CER1* mostraron una mayor susceptibilidad a la bacteria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae* y al hongo necrotófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Bourdenx *et al.*, 2011). Según lo propuesto por los autores, la menor permeabilidad cuticular podría disminuir la percepción de PAMPs por parte de los receptores de membrana, retrasando la activación de la respuesta de defensa. De la misma manera, como se ha discutido en el Capítulo I, la cutícula engrosada y menos permeable de las hojas de 'Okitsu' impide la percepción de la bacteria *X. aurantifolii* tipo C, y por lo tanto no se desencadena en este cultivar la HR que se genera en 'Clemenules' (**Figura 4.I.5 B**). Dado

que *X. citri* no genera una HR en 'Okitsu', la mayor formación de alcanos en este cultivar podría contribuir a la defensa frente a *Xanthomonas* a modo de barrera preformada, constituyendo una cutícula más espesa y menos permeable que contribuye a la resistencia mediante los mecanismos propuestos en el Capítulo II. Por otro lado, en las hojas del cultivar 'Clemenules' podría acumularse una mayor cantidad de aldehídos, de acuerdo a los mayores niveles de *CER3*.

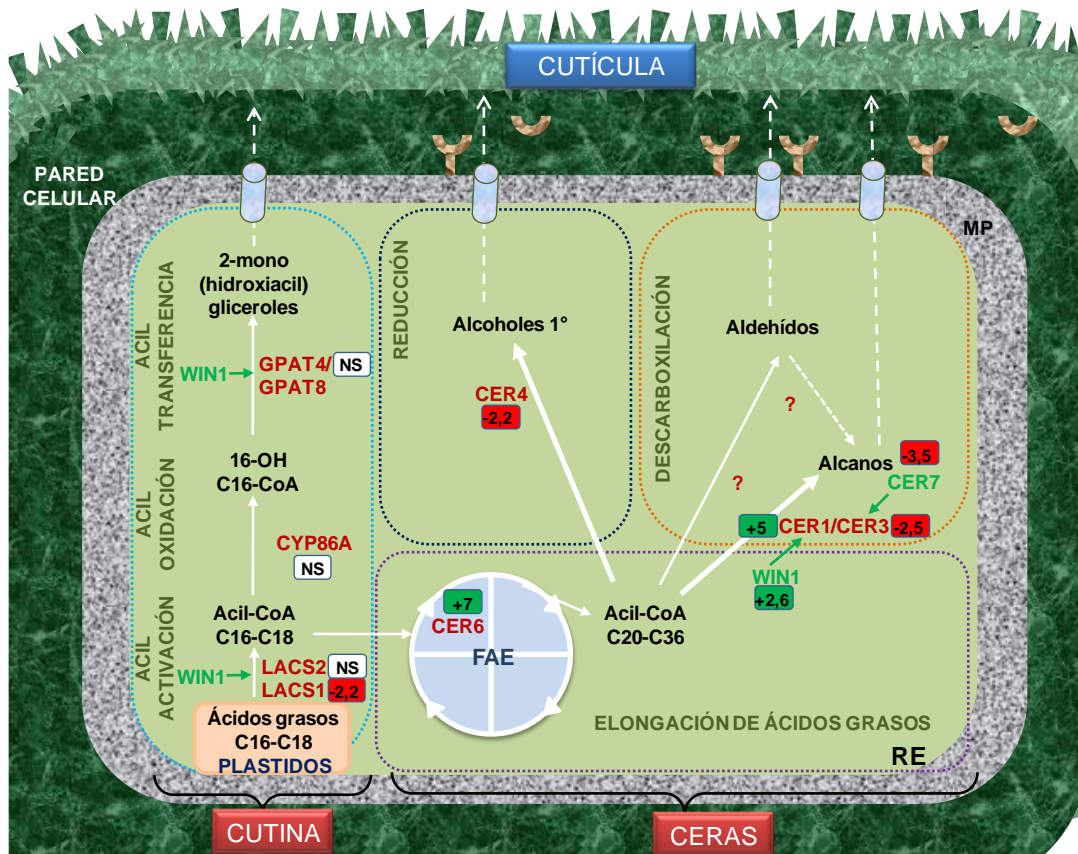


Figura 4.III.7. Vías diferenciales de biosíntesis de cutícula entre los cvs. 'Clemenules' y 'Okitsu', en células epidérmicas de hojas de 18 días de edad. La expresión de los genes en 'Okitsu' fue relativizada con respecto a 'Clemenules'. Los recuadros de color verde indican inducción del gen, mientras que los de color rojo indican represión. Se muestran los valores del cultivar resistente de acuerdo a los resultados presentados en la Figura 4.III.6. NS: diferencias no significativas.

Cabe destacar que parte de los alcanos producidos por los genes *CER1* y *CER3* pueden ser sustratos para la biosíntesis de alcoholes secundarios y cetonas, mediada por la enzima MAH1. Sin embargo, el nivel de expresión de *MAH1* no muestra cambios

significativos entre ambos cultivares, indicando que la cantidad de estos compuestos sería similar en hojas de 18 días de edad.

Otra vía que pueden seguir los VLCFAs es la formación de alcoholes primarios, catalizada por CER4. Las mutantes *cer4* de *Arabidopsis* presentan una severa reducción de alcoholes primarios y ésteres en las ceras. Así, fue demostrado que CER4 codifica una Acil-CoA reductasa involucrada en la formación de alcoholes primarios que varían entre 24 y 28 átomos de carbono (C24-C28). Debido a que los alcoholes de C30 se encuentran presentes en las mutantes, se considera que otra enzima, aún no descubierta, participaría en su biosíntesis (Rowland *et al.*, 2006). La inducción significativa de CER4 en hojas de 'Clemenules' indicaría una mayor producción de alcoholes primarios en este estadio de desarrollo. Se desconoce si la presencia de estos compuestos, junto con el aumento de aldehídos podría ser la causa de una mayor permeabilidad observada en este cultivar. Hasta el presente no han sido publicado trabajos en los cuales se muestre que los niveles de expresión de CER4 afecte el comportamiento frente a patógenos, por lo cual no se puede predecir el efecto que puede tener la leve represión de este gen en 'Okitsu' en la resistencia frente a *X. citri* (**Figura 4.III.6 y 7**).

La producción de cutina y ceras es un proceso regulado en parte por WIN1. En *Arabidopsis* se demostró que la sobreexpresión de WIN1 induce inmediatamente (30 min) la expresión de muchos de los genes involucrados en la biosíntesis de cutina, tales como LACS2 y GPAT4; mientras que en una segunda etapa se inducen los genes implicados en la biosíntesis de ceras, como CER1 (Kannangara *et al.*, 2007, Broun *et al.* 2004). En hojas de 18 días de edad, WIN1 se indujo significativamente en 'Okitsu' con respecto a 'Clemenules'. Si bien esta inducción está acompañada por un aumento de 5 órdenes de magnitud en los niveles de CER1, este incremento de WIN1 no se manifiesta en aumentos en los niveles de transcriptos de LACS1, LACS2 o GPAT4 (**Figura 4.III.6 y 7**). Probablemente, esto se deba a que la inducción de la síntesis de cutina por parte de WIN1 en hojas de 'Okitsu' ha ocurrido ya previamente, generando un mayor espesor de la cutícula en hojas de 18 días, como fue demostrado en el **Capítulo II**. Por otra parte, en hojas de 'Clemenules' de 18 días

de edad, la biosíntesis de cutina se encuentra inducida a través de la expresión diferencial de *LACS1*, que participa en los pasos iniciales de la biosíntesis de este biopolímero.

En su conjunto, estos resultados indican un desarrollo más rápido de la cutícula en las hojas de 'Okitsu' en comparación con las de 'Clemenules', como ha sido propuesto en el **Capítulo II**. Además, el hecho de que en hojas de 36 días de 'Clemenules' exista una alta inducción del transportador ABC dependiente de ATP con respecto a 'Okitsu', podría señalar que en esta instancia aún continúa el transporte y la deposición de ceras hacia la superficie cuticular en este cultivar susceptible, consecuencia de un menor desarrollo cuticular en etapas previas. Los demás genes analizados no se encuentran diferencialmente inducidos en hojas de 36 días de edad de ambos cultivares de mandarino. Estos resultados concuerdan con los presentados en el **Capítulo II** acerca del espesor y la permeabilidad de la cutícula, similares entre ambos cultivares en las hojas de 36 días de edad (**Figura 4.II.3 y 5**).

Necesariamente, el conocimiento al cual se ha llegado en *Arabidopsis* debe ser complementado con información de otras especies de plantas, dado que a pesar de ser una planta modelo, *Arabidopsis* presenta características atípicas en su cutícula (Nawrath, 2006). Su espesor cuticular es ultrafino (22 nm en hojas y de 45 nm en pecíolos), notablemente menor al de la mayoría de las especies (Franke *et al.*, 2005). Además, parte de los monómeros que componen la cutina de *Arabidopsis* son diferentes de los descritos para la mayoría de las especies, porque consisten de altas cantidades de ácidos dicarboxílicos de 16 y 18 C (Franke *et al.*, 2005). Todas estas razones contribuyen a considerar que los mecanismos de biosíntesis de cutícula en cítricos y en otras especies pueden presentar variaciones con respecto a lo publicado para *Arabidopsis*. Por consiguiente, es importante destacar que los genes analizados deberían ser estudiados en otros estados de desarrollo de las hojas para confirmar los resultados obtenidos, y añadirse nuevos genes al análisis.

Si bien se requiere realizar una mayor cantidad de estudios para dilucidar completamente cuáles son las rutas biosintéticas que generan un mayor espesor cuticular en hojas jóvenes del cv. 'Okitsu', este acercamiento permite comenzar a comprender

algunos de los procesos que ocurren. Algunos de los genes que se expresaron diferencialmente en este estudio podrían ser candidatos a incluir en un programa de mejoramiento para resistencia a cancrrosis. Por otro lado, la microdissección de la epidermis y el análisis posterior de la expresión génica del transcriptoma completo, a través de secuenciación total del ARN o análisis por microarreglos, son herramientas imprescindibles para el descubrimiento de nuevos genes involucrados específicamente en la biosíntesis de la cutícula en cítricos. En trabajos realizados en frutos de *C. clementina* mediante microdissección de tejidos específicos, el perfil transcriptómico de la epidermis mostró una alta proporción de genes de función desconocida (Matas *et al.*, 2010), por lo cual, la comparación con especies modelo como *Arabidopsis* puede estar enmascarando la importancia de otros genes y mecanismos involucrados en biosíntesis que no son conocidos en esta especie.

4.III.3.2. La cutícula funciona como una barrera de defensa no sólo pasiva, sino también activa contra patógenos

Tradicionalmente se ha considerado a la cutícula como una barrera de defensa pasiva, eficiente contra la mayoría de los patógenos que colonizan la superficie de las plantas (Reina-Pintó & Yephremov, 2009). Así, plantas mutantes de maíz que presentan menores niveles de ceras, son más susceptibles a la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, ya que el menor espesor cuticular permite una mayor difusión de nutrientes a través de la cutícula y una mayor acumulación de agua que favorece el crecimiento bacteriano (Marcell & Beattie, 2002). Por otro lado, plantas mutantes de *Arabidopsis lacs2*, que presentan una cutícula aproximadamente 1,6 veces más fina que las plantas salvajes son más susceptibles a bacterias hemibiotróficas, como *Pseudomonas syringae*. Debido a que estas mutantes presentan una cutícula más permeable al agua, la colonización de la bacteria se ve favorecida por un aumento en la difusión de nutrientes y agua (Tang *et al.*, 2007).

Estudios genéticos recientes en *Arabidopsis* demuestran que la cutícula no sólo actúa como una barrera física frente a la invasión por patógenos, sino que también es una fuente potencial de moléculas elicitoras y de señalización, involucradas en los circuitos que conducen a la defensa del hospedador (Reina-Pinto & Yephremov, 2009; Raffaele *et al.*, 2009). Particularmente, los VLCFAs y sus derivados, incluidos los esfingolípidos, están involucrados en esta respuesta de defensa.

Son numerosos los estudios que han demostrado que los lípidos cuticulares pueden jugar un rol como moléculas mensajeras en interacciones planta-patógeno (Kolattukudy *et al.*, 1995; Raffaele, *et al.*, 2009; Reina-Pinto & Yephremov, 2009). Por ejemplo, para algunos hongos, la liberación de los monómeros de cutina desencadena la secreción de cutinasas (Woloshuk & Kolattukudy, 1986), mientras que algunos metabolitos de la cutina y de ceras inician la formación de apresorios y favorecen así la penetración de algunos hongos (Kolattukudy *et al.*, 1995; Podila *et al.*, 1993; Reisinger *et al.*, 2006). Por el contrario, en otras interacciones planta-patógeno los monómeros de cutina pueden inducir la expresión de genes relacionados a la patogénesis y elicitar la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que incrementa las defensas de las plantas (Kim *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Por otro lado, plantas de *Arabidopsis* mutantes *lacs2* que presentan claros defectos cuticulares son muy resistentes a *Botrytis cinerea*, debido a que los PAMPs del hongo son más fácilmente percibidos por la planta al traspasar la cutícula, y se desencadena la respuesta de defensa de la misma (Tang *et al.*, 2007). En líneas generales, se considera que las señales derivadas de la cutícula actúan negativamente sobre los hongos necrotrófos, al desencadenar la respuesta de defensa de la planta.

Es importante destacar que los mecanismos que operan en cada interacción planta-patógeno son muy específicos, y por lo tanto una cutícula más fina puede favorecer al desarrollo de algunos patógenos pero desfavorecer el de otros a través de diferentes mecanismos, pasivos o activos.

En esta Tesis Doctoral se ha propuesto que la cutícula de 'Okitsu' posee un rol como barrera de defensa preformada contra *X. citri*. Más allá de este rol pasivo que ha sido

comprobado, sería interesante determinar si la cutícula de los cítricos cumple también algún rol activo en su interacción con la bacteria. Como se ha demostrado en el **Capítulo I**, la cutícula engrosada y menos permeable de las hojas de 'Okitsu' impide la percepción de la bacteria *X. aurantifolii* tipo C y por lo tanto no se desencadena en este cultivar la HR que se genera en 'Clemenules' (**Figura 4.I.5 B**). Por lo tanto, si bien no se esperaría que la cutícula funcione activamente en la defensa frente a *X. citri* en el cv. 'Okitsu', no debería descartarse que en 'Clemenules' o en otras especies cítricas se active una respuesta de defensa. En este sentido, y según lo propuesto en la bibliografía, la cutícula más fina y permeable permitiría que se detecten los PAMPs de la bacteria, induciendo una PTI, pero posteriormente esta respuesta de defensa sería suprimida por el xantano de *X. citri* u otro supresor bacteriano (Enrique *et al.*, 2011). El estudio de la expresión génica en hojas a tiempos tempranos post-inoculación con *X. citri* podría proveer información en este sentido.

5. Discusión Integradora

5. Discusión Integradora

Como se ha planteado a lo largo de esta Tesis Doctoral, los cultivares resistentes son la mejor solución a largo plazo para el manejo de la cancrrosis bacteriana de los cítricos. Sin embargo, existen muy pocos cultivares de importancia comercial que presentan resistencia a *X. citri*. Por mucho tiempo, 'Okitsu' ha sido citado como un cultivar resistente a la cancrrosis de los cítricos causada por *X. citri* (do Amaral *et al.*, 2010; Gottwald *et al.*, 2002; Shiotani *et al.*, 2008). Sin embargo, las características de esa resistencia no habían sido cuantificadas a campo ni correlacionadas con el comportamiento en condiciones controladas. Tampoco habían sido descritas las razones de esta resistencia. En esta Tesis de Doctorado, se ha confirmado que la resistencia en hojas jóvenes de 'Okitsu' se basa en la combinación de varios mecanismos de defensa: un desarrollo más rápido de la cutícula; superficie cuticular lisa, sin depresiones que generen sitios protegidos para la bacteria; y menor apertura estomática, a causa de los rebordes cuticulares. Además, la cutícula de las hojas de 18 días de 'Okitsu' presenta una permeabilidad significativamente menor con respecto a la de hojas de 'Clemenules', que impide el ingreso de *X. citri* al mesófilo. Por otro lado, se ha determinado que en la epidermis de las hojas jóvenes del cv. 'Okitsu' se induce significativamente el gen *CER6*, relacionado a la síntesis de VLCFAs, primer paso de la biosíntesis de ceras, y otros genes involucrados en la síntesis y regulación de la vía de producción de alcanos, como *CER1* y *WIN1*. Si bien son requeridos más estudios para dilucidar completamente cuáles son las vías que generan un mayor espesor cuticular en hojas jóvenes del cv. 'Okitsu', algunos de los genes que se expresaron diferencialmente en este estudio podrían ser candidatos a incluir en un programa de mejoramiento en cítricos para resistencia a cancrrosis.

La complejidad para realizar mutantes artificiales en plantas perennes leñosas como los cítricos (Liu *et al.*, 2012) dificulta la confirmación de los resultados presentados en esta Tesis. Otra estrategia para el estudio de la función génica en plantas es mediante el silenciamiento génico, inducido por virus o mediado por la expresión de ARN de doble cadena con estructura tipo "hairpin" (ARNhp) (Helliwell & Waterhouse, 2003; Fusaro *et al.*,

2006, Enrique *et al.*, 2011, Agüero *et al.*, 2012). En consecuencia, el empleo de esta herramienta biotecnológica en el cv. 'Okitsu' contribuirá a validar si la expresión diferencial de los genes candidatos, involucrados en la síntesis y regulación de la cutícula es la responsable de una mayor resistencia a la cancrrosis bacteriana. Por otro lado, la transformación genética es una alternativa prometedora que puede resolver muchos problemas del mejoramiento clásico de los cítricos como la alta heterocigosis, y los largos períodos de juvenilidad. Sin embargo, antes de comenzar el complicado proceso de transgénesis en especies cítricas, se recomienda evaluar la utilidad potencial de un gen candidato por estudios de expresión transiente (Sendín *et al.*, 2012). La transformación genética y recuperación de transformantes ha sido lograda en varias especies de cítricos y géneros relacionados, como por ejemplo el limón rugoso (*Citrus jambhiri*), naranjo dulce, mandarinos, citrange 'Carrizo' (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*), *Poncirus trifoliata*, y lima mexicana (Peña & Navarro, 1999). Sin embargo, la regeneración *in vitro* de tejidos y la transformación de algunas especies como *C. limon* continúa siendo recalcitrante.

Entre los genes que se han visto diferencialmente expresados en este estudio, específicamente, el gen *CER6* de *Arabidopsis*, presenta un promotor que es muy efectivo para generar altos niveles de expresión génica en epidermis de plantas, y su acción ha sido demostrada no sólo en *Arabidopsis* sino también en otras especies no relacionadas como tabaco (Hooker *et al.*, 2002). Así, este promotor puede ser una herramienta muy útil para la modificación de las características superficiales de los cultivos a través de la expresión de genes en la epidermis (Hooker *et al.*, 2002).

Una característica notable de muchas hojas es que el agua tiende a formar gotas que resbalan, arrastrando las partículas y suciedad de la superficie de la hoja. La eficiencia de este mecanismo de autolimpieza, denominado "efecto *Lotus*", varía entre especies y durante la ontogenia de órganos, pero se ha correlacionado con la abundancia de ceras epicuticulares que repelen el agua (revisado por Yeats & Rose, 2013). Se cree que esta característica de superficie autolimpiante ayuda a prevenir la germinación de esporas de patógenos o de acumulación de bacterias, arrastrándolas. En base al descubrimiento del "efecto *Lotus*", ha sido propuesto que sería importante el desarrollo de materiales

biomiméticos eficaces, que permitan simular una superficie autolimpiante en cultivos agrícolas con altos grados de hidrofobicidad (Bhushan, 2012). En este sentido, debido a que las ceras naturales de los frutos cítricos se remueven parcialmente durante el prolongado lavado y procesado en la planta de empaque, las mismas son reemplazadas con productos sintéticos o naturales similares para prevenir el deshidratado de la fruta o los desórdenes fisiológicos, además de generar un aspecto brillante (Njombolwana *et al.*, 2013). Las ceras más utilizadas para este fin son las ceras en emulsión, principalmente en base a carnauba, una cera que proviene de la palmera nativa de Brasil *Copernicia cerifera*, y de polietileno. De acuerdo a los resultados presentados, las hojas de 18 días de edad del cv. 'Okitsu' presentarían un “efecto *Lotus*”. Sería de gran importancia determinar la composición de la cutícula de este cultivar a través de estudios de metabolómica para analizar la posibilidad de desarrollar productos biomiméticos en base a estos componentes.

6. Resumen

6. Resumen

La zona central de la provincia de Santa Fe presenta condiciones agroecológicas adecuadas para la producción de cítricos, aunque para extender la producción de estos frutales, se hace necesaria la difusión de los conocimientos de adaptación de los diferentes cultivares, así como la información referente al comportamiento frente a las enfermedades más importantes de los cítricos. En relación a este punto, la cancrrosis bacteriana de los cítricos (CBC), causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), es una de las enfermedades que mayores daños causa en las plantaciones de la provincia. Entre todas las medidas de manejo aplicables a la CBC, el cultivo de genotipos resistentes es la mejor solución a largo plazo. Afortunadamente, existen diferencias de susceptibilidad entre las especies y cultivares del género *Citrus*. Específicamente, entre los genotipos de mandarino, ha sido reportado que el cv. 'Okitsu' es más resistente al desarrollo del cancro que el cv. 'Clemenules', aunque los mecanismos involucrados en esta resistencia diferencial son desconocidos. En la presente Tesis Doctoral se describen los resultados obtenidos en el análisis de la interacción entre *X. citri* y los cultivares de mandarino 'Clemenules' y 'Okitsu', tanto bajo condiciones de campo como bajo condiciones de crecimiento controladas. Las evaluaciones a campo demostraron que las hojas de 'Okitsu' presentan un menor período de susceptibilidad a *X. citri*. Por otro lado, en cámara de crecimiento se comprobó que la resistencia a cancrrosis en el cv. 'Okitsu' se “quiebra” cuando las hojas son inoculadas con *X. citri* por el método de infiltración, indicando que la resistencia en este cultivar depende de la integridad de las barreras superficiales de las hojas. Por métodos de inoculación no invasivos como la aspersion, las diferencias entre ambos cultivares en la susceptibilidad a *X. citri* fueron mayores en hojas inoculadas entre los 15 y 22 días de edad, por lo cual se analizaron las posibles barreras de defensa en este estadio en particular. El estudio de la dinámica temporal y espacial de las barreras estructurales de la hoja de ambos cultivares de mandarino, sugiere que en 'Okitsu' la cutícula constituye una barrera de defensa constitutiva que impide el ingreso de *X. citri* al mesófilo de las hojas. Un acercamiento al estudio de la biogénesis de la cutícula en ambos cultivares de mandarino permitió identificar genes candidatos, los cuales podrán ser utilizados para el

desarrollo de estrategias biotecnológicas que permitan manipular la composición de la cutícula y desarrollar cultivares resistentes a CBC u a otros patógenos de cítricos.

7. Bibliografía

- Agostini, J.P. (2007) Manejo integrado de enfermedades de los frutales cítricos. En: Árboles frutales, ecofisiología, cultivo y aprovechamiento; Editor: Sozzi, G.O.; Ed. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, pp. 484-487.
- Agrios, G.N. (2005) Plant Pathology, 5th Ed.; Elsevier Academic Press, USA, 922 pp.
- Agüero, J.; Ruiz-Ruiz, S.; Vives, M.C.; Velázquez, K.; Navarro, L.; Peña, L.; Moreno, P.; Guerri, J. (2012). Development of viral vectors based on *Citrus leaf blotch virus* to express foreign proteins or analyze gene function in *Citrus* plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 25, 1326-1337.
- Agustí, M. (2003) Citricultura, Segunda Ed.; Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 422 pp.
- Agustí, M.; Zaragoza, S.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Hack, H.; Klose, R.; Staub, R. (1997) Adaptation de l'échelle BBCH à la description des stades phénologiques des agrumes du genre *Citrus*. *Fruits*, 52, 287-295.
- Al-Saadi, A.; Reddy, J.D.; Duan, Y.P.; Brunings, A.M.; Yuan, Q.; Gabriel, D.W. (2007) All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20, 934-943.
- Aslam, S.N.; Newman, M.A.; Erbs, G.; Morrissey, K.L.; Chinchilla, D.; Boller, T.; Jensen, T.T.; De Castro, C.; Ierano, T.; Molinaro, A.; Jackson, R.W.; Knight, M.R.; Cooper, R.M. (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr. Biology*, 18, 1078-1083.
- Bach, L.; Michaelson, L.V.; Haslam, R.; Bellec, Y.; Gissot, L.; Marion, J.; Da Costa, M.; Boutin, J.; Miquel, M.; Tellier, F.; Domergue, F.; Markham, J.E.; Beaudin, F.; Napier, J.A.; Faure, J.D. (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 14727-14731.
- Bastos Segatto, F.; Bisognin, D.A.; Benedetti, M.; Camargo da Costa, L.; Rampelotto, M.V.; Teixeira Nicoloso, F. (2004) Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Ciência Rural*, 34, 1597-1601.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89, 353-359.
- Beattie, G.A. & Marcell, L.M. (2002) Effect of alterations in cuticular wax biosynthesis on the physicochemical properties and topography of maize leaf surfaces. *Plant Cell Environ.*, 25, 1-16.
- Beattie, G.A. (2002) Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. En: *Phyllosphere Microbiology*; Editores: Lindow, S.E.; Hecht-Poinar, E.I.; Elliott, V.J.; APS Press, St. Paul, USA, pp. 3-26.
- Behlau, F.; Belasque Jr., J.; Bergamin Filho, A.; Graham, J.H.; Leite Jr., R.P.; Gottwald, T.R. (2008) Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. *Crop Prot.*, 27, 807-813.
- Beisson, F. & Ohlrogge, J. (2012) Knitting a polyester skin. *Nat. Chem. Biol.*, 8, 603-604.
- Beisson, F.; Beisson, Y.L.; Pollard, M. (2012) Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 15, 329-337.
- Belasque Jr., J.; Bassanezi, R.B.; Sposito, M.B.; Ribeiro, L.M.; Jesus Jr., W.C.; Amorim, L. (2005) Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. *Fitopatol. Bras.*, 30, 387-393.
- Bent, A.F. & Mackey, D. (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 399-436.
- Berlyn, G.P. & Miksche, J.B. (1976) Botanical microtechnique and citochemistry; Iowa State University Press, Ames, Iowa, 325 pp.

- Bernard, A. & Joubès, J. (2013) *Arabidopsis* cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Prog. Lipid Res.*, 52, 110-129.
- Bernard, A.; Domergue, F.; Pascal, S.; Jetter, R.; Renne, C.; Faure, J.D.; Haslam, R.P.; Napier, J.A.; Lessire, R.; Joubès, J. (2012) Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell*, 24, 3106-3118.
- Bessire, M.; Chassot, C.; Jacquat, A.C.; Humphry, M.; Borel, S.; MacDonald Comber Petetot, J.; Metraux, J.P.; Nawrath, C. (2007) A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO J.*, 26, 2158-2168.
- Bhushan, B. (2012) Bioinspired structured surfaces. *Langmuir*, 28, 1698-1714.
- Bird, S.M. & Gray, J.E. (2003) Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytol.*, 157, 9-23.
- Boller, T. & Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: Perception of MAMP and danger signals by pattern – recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 379-406.
- Bourdenx, B.; Bernard, A.; Domergue, F.; Pascal, S.; Léger, A.; Roby, D.; Pervent, M.; Vile, D.; Haslam, R.P.; Napier, J.A.; Lessire, R.; Joubès, J. (2011) Overexpression of *Arabidopsis* ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.*, 156, 29-45.
- Branda, S.S.; Vik, S.; Friedman, L.; Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.*, 13, 20-26.
- Broun, P.; Poindexter, P.; Osborne, E.; Jiang, C.Z.; Riechmann, J.L. (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 4706-4711.
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Path.*, 4, 141- 157.
- Buda, G.J.; Isaacson, T.; Matas, A.J.; Paolillo, D.J.; Rose, J.K. (2009) Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *Plant J.*, 60, 378-385.
- Buttner, D. & Bonas, U. (2002) Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.*, 21, 5313-5322.
- Buttner, D. & Bonas, U. (2009) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21, 1-27.
- Cadmus, M.C.; Rogovin, S.P.; Burton, K.A.; Pittsley, J.E.; Knutson, C.A.; Jeanes, A. (1976) Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can. J. Microbiol.*, 22, 942-948.
- Camilli, A. & Bassler, B.L. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311, 1113-1116.
- Canteros, B. I. (2004) Management of Citrus canker in Argentina. A review, Xth Int. Citrus Congress, Agadir, Morocco, Abstr. No. 90.
- Canteros, B.I. (1996) Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, Proceedings of the 9th. International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, Madras, India, 459 pp.
- Canteros, B.I. (2001) Cancrosis de los citrus. *IDIA XXI*, 1, 23-27.
- Cantuarias-Avilés, T.; de Assis Alves Mourão Filho, F.; Sanches Stuchi, E.; Rodrigues da Silva, S.; Espinosa-Nuñez, E. (2009) Tree performance and fruit yield and quality of 'Okitsu' Satsuma mandarin grafted on 12 rootstocks. *Sci. Hortic.*, 123, 318-322.
- Cañizares, A.; Sanabria, M.E.; Rodríguez, D.A.; Perozo, Y. (2003) Características de los estomas, índice y densidad estomática de las hojas de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre ocho patrones cítricos. *Rev. UDO Agríc.*, 3, 59-64.

- Cernadas, R.A.; Camillo, L.R.; Benedetti, C.E. (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol. Plant Pathol.*, 9, 609-631.
- Chen, P.S.; Wang, L.Y.; Chen, Y.J.; Tzeng, K.C.; Chang, S.C.; Chung, K.R.; Lee, M.H. (2012) Understanding cellular defence in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 79, 1-12.
- Chen, X.; Goodwin, S.M.; Boroff, V.L.; Liu, X.; Jenks, M.A. (2003) Cloning and characterization of the WAX2 gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell*, 15, 1170-1185.
- Chiesa, M.A.; Siciliano, M.F.; Ornella, L.; Roeschlin, R.A.; Favaro, M.A.; Delgado, N.P.; Sendín, L.N.; Orce, I.G.; Ploper, L.D.; Vojnov, A.A.; Vacas, J.G.; Filippone, M.P.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R. (2013) Characterization of a variant of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that triggers a host-specific defense response. *Phytopathology*, 103, 555-564.
- Christiano, R.S.C. (2006) Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus sinensis*). Tesis doctoral. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Universidade de São Paulo, Brasil.
- Civerolo, E.L. (1984) Bacterial canker disease of citrus. *J. Rio Grande Valley Horticultural Soc.*, 37, 127-145.
- Cubero, J. & Graham, J.H. (2004) Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Dis.*, 88, 1179-1188.
- Cui, X. & Harling, R. (2005) N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum sensing blockage, a novel strategy for attenuating pathogenicity of gram negative bacterial plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.*, 111, 327-339.
- D'Ambroggio de Argüeso, A. (1986) Manual de Técnicas en Histología Vegetal; Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 83 pp.
- da Rocha, A.B. & Hammerchmidt, R. (2005) History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortScience*, 15, 518-529.
- da Silva, A.C.; Ferro, J.A.; Reinach, F.C.; Farah, C.S.; Furlan, L.R.; Quaggio, R.B.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Van Sluys, M.A.; Almeida, N.F.; Alves, L.M.; do Amaral, A.M.; Bertolini, M.C.; Camargo, L.E.; Camarotte, G.; Cannavan, F.; Cardozo, J.; Chambergo, F.; Ciapina, L.P.; Cicarelli, R.M.; Coutinho, L.L.; Cursino-Santos, J.R.; El-Dorry, H.; Faria, J.B.; Ferreira, A.J.; Ferreira, R.C.; Ferro, M.I.; Formighieri, E.F.; Franco, M.C.; Greggio, C.C.; Gruber, A.; Katsuyama, A.M.; Kishi, L.T.; Leite, R.P.; Lemos, E.G.; Lemos, M.V.; Locali, E.C.; Machado, M.A.; Madeira, A.M.; Martinez-Rossi, N.M.; Martins, E.C.; Meidanis, J.; Menck, C.F.; Miyaki, C.Y.; Moon, D.H.; Moreira, L.M.; Novo, M.T.; Okura, V.K.; Oliveira, M.C.; Oliveira, V.R.; Pereira, H.A.; Rossi, A.; Sena, J.A.; Silva, C.; de Souza, R.F.; Spinola, L.A.; Takita, M.A.; Tamura, R.E.; Teixeira, E.C.; Tezza, R.I.; Trindade dos Santos, M.; Truffi, D.; Tsai, S.M.; White, F.F.; Setubal, J.C.; Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417, 459-463.
- Daniels, M.J.; Barber, C.E.; Turner, P.C.; Cleary, W.G.; Sawczyc, M.K. (1984) Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 2447-2455.
- Das, A.K. (2003) Citrus canker- a review. *J. Appl. Hort.*, 5, 52-60.
- Daszkowska-Golec, A. & Szarejko, I. (2013) Open or close the gate - Stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front. Plant Sci.*, 4, 138.

- Deng, Z.N.; Xu, L.; Li, D.Z.; Long, G.Y.; Liu, L.P.; Fang, F.; Shu, G.P. (2009) Screening citrus genotypes for resistance to canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). *Plant Breed.*, 129, 341-345.
- Dienelt, M.M. & Lawson, R.H. (1989) Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: transmission electron microscopy. *Phytopathology*, 79, 336-348.
- Dietrich, C.R.; Perera, M.A.D.N.; Yandeu-Nelson, M.D.; Meeley, R.B.; Nikolau, B.J.; Schnable, P.S. (2005) Characterization of two GL8 paralogs reveals that the 3-ketoacyl reductase component of fatty acid elongase is essential for maize (*Zea mays* L.) development. *Plant J.*, 42, 844-861.
- Do Amaral, A.M.; Carvalho, S.A.; Silva, L.F.C.; Machado, M.A. (2010) Reaction of genotypes of *Citrus* species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under greenhouse conditions. *J. Plant Pathol.*, 92, 519-524.
- Do Amaral, A.M.; Toledo, C.P.; Baptista, J.C.; Machado, M.A. (2005) Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by Electroporation. *Fitopatol. Bras.*, 30, 292-294.
- Domínguez, E.; Heredia-Guerrero, J.A.; Heredia, A. (2011) The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.*, 189, 938-949.
- El Yacoubi, B.; Brunings, A.M.; Yuan, Q.; Shankar, S.; Gabriel, D.W. (2007) In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1612-1621.
- Enrique, R.; Siciliano, F.; Favaro, M.A.; Gerhardt, N.; Roeschlin, R.A.; Rigano, L.; Sendín L.; Castagnaro, A.; Vojnov, A.; Marano, M.R. (2011) Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 394-407.
- Erbs, G.; Silipo, A.; Aslam, S.; De Castro, C.; Liparoti, V.; Flagiello, A.; Pucci, P.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Molinaro, A.; Newman, M.A.; Cooper, R.M. (2008) Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem. Biol.*, 15, 438-448.
- Esau, K. (1977) *Anatomy of Seed Plants*; 2nd Ed., Wiley, New York, 550 pp.
- Fawcett, H.S. & Jenkins, A.E. (1933) Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. *Phytopathology*, 23, 820-824.
- Franke, R.; Briesen, I.; Wojciechowski, T.; Faust, A.; Yephremov, A.; Nawrath, C.; Schreiber, L. (2005) Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues: a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, 66, 2643-2658.
- Freeman, B.C. & G.A. Beattie. (2008) An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Fu, X.-Z.; Gong, X.-Q.; Zhang, Y.-X.; Wang, Y.; Liu, J.-H. (2012). Different transcriptional response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between kumquat and sweet orange with contrasting canker tolerance. *PLoS ONE* 7(7):e41790, doi:10.1371/journal.pone.0041790.
- Fusaro, A.F.; Matthew, L.; Smith, N.A.; Curtin, S.J.; Dedic-Hagan, J.; Ellacott, G.A.; Watson, J.M.; Wang, M.B.; Brosnan, C.; Carroll, B.J.; Waterhouse, P.M. (2006) RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep.*, 7, 1168-1175.
- Garbay, B.; Tautu, M.T.; Costaglioli, P. (2007) Low level of pathogenesis-related protein 1 mRNA expression in 15-day-old *Arabidopsis cer6-2* and *cer2 eceriferum* mutants. *Plant Sci.*, 172, 299-305.
- García, M.S.; Leva, P.E.; Zbrun, M.E.; Veles, M.A.; Gandolfo, J.A.; Valtorta, S.E. (2002) Tendencias de índices meteorológicos y biometeorológicos. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias*, 1, 27-36.

- Gariglio, N.F.; Mendow, M.; Weber, M.E.; Favaro, M.A.; González-Rossia, D.E.; Pilatti, R.A. (2009) Phenology and reproductive traits of peaches and nectarines in Central-East Argentina. *Sci. Agric.*, 66, 757-763.
- Girard, A.-L.; Mounet, F.; Lemaire-Chamley, M.; Gaillard, C.; Elmorjani, K.; Vivancos, J.; Runavot, J.-L.; Quemener, B.; Petit, J.; Germain, V.; Rothan, C.; Marion, D.; Bakan, B. (2012) Tomato GDSSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell*, 24, 3119-3134.
- Gmitter, F.G. (2012). New Citrus Genome Sequence Resources, Plant and Animal Genome XX Conference, San Diego, Estados Unidos.
- Gochez, A.M. & Canteros, B.I. (2008) Resistance to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* in an accession of *Citrus* sp. similar to grapefruit. *Plant Dis.* 92, 652.
- Goldschmidt, E.E. & Koch, K.E. (1996) Citrus. En: Photoassimilate distribution in plants and crops: Source-Sink relationships; Editores: Zamski, E. & Schaffer, A.A.; Ed. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 797-822.
- Goodman, R.N. (1982) The infection process. En: Phytopathogenic Prokaryotes; Editores: Mount, M.S. & Lacy, G.H.; Academic Press, London, pp. 31-62.
- Goodstein, D.M.; Shu, S.; Howson, R.; Neupane, R.; Hayes, R.D.; Fazo, J.; Mitros, T.; Dirks, W.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Rokhsar, D.S. (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, D1, D1178-D1186.
- Goto, M. (1992) Plant diseases of international importance. Citrus canker. En: Diseases of Fruit Crops; Editores: Kumar, J.; Chaube, H.S.; Sing, U.S. & Mukhopadhyay, A.N.; Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 170-208.
- Gottwald, T.R. & Graham, J.H. (1992) A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*, 82, 930-935.
- Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Bock, C.; Bonn, G.; Civerolo, E.; Ireye, M.; Leite, R.; McCollum, G.; Parker, P.; Ramallo, J.; Riley, T.; Schubert, T.; Stein, B.; Taylor, E. (2009) The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Prot.*, 28, 508-524.
- Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Civerolo, E.L.; Barrett, H.C.; Hearn, C.J. (1993) Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Dis.*, 77, 1004-1007.
- Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Schubert, T.S. (1997) An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leafminer. *Fruits*, 52, 371-378.
- Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Schubert, T.S. (2002) Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. DOI: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Graham, J.H.; Cubero, J.; Gottwald, T.R.; Achor, D.S. (2004) *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.*, 5, 1-15.
- Graham, J.H.; Gottwald, T.R.; Browning, H.S.; Achor, D.S. (1996) Citrus leafminer exacerbated the outbreak of Asiatic citrus canker in South Florida. *Proc. Internat. Conf. of Citrus Leafminer*, Orlando, Florida, Gainesville. 83 pp.
- Graham, J.H.; Gottwald, T.R.; Riley, T.D.; Bruce, M.A. (1992a) Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology*, 85, 111-117.
- Graham, J.H.; Gottwald, T.R.; Riley, T.R.; Achor, D. (1992b) Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* strains in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82, 1319-1325.
- Grant, J.J. & Loake, G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.*, 124, 21-29.

- Grennan, A.K. (2006) Plant response to bacterial pathogens. Overlap between innate and gene-for-gene defense response. *Plant Physiol.*, 142, 809-811.
- Gudesblat, G.E., Torres, P.S.; Vojnov, A.A. (2009) *Xanthomonas campestris* overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.*, 149, 1017-1027.
- Hann, D.R. & Rathjen, J.P. (2007) Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.*, 49, 607-618.
- Haslam, T.M. & Kunst, L. (2013) Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci.*, 210, 93-107.
- Hasse, C.H. (1915) *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. A preliminary report. *J. of Agriculture Research*, 4, 97-100.
- He, P.; Shan, L.; Lin, N.C.; Martin, G.B.; Kemmerling, B.; Nurnberger, T.; Sheen, J. (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, 125, 563-575.
- He, S.Y. & Jin, Q. (2003) The Hrp pilus: learning from flagella. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 15-19.
- Helliwell, C. & Waterhouse, P. (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*, 30, 289-295.
- Heredia, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1620, 1-7.
- Hooker, T.; Lam, P.; Zheng, H.; Kunst, L. (2007) A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 904-913.
- Hooker, T.S.; Millar, A.A.; Kunst, L. (2002) Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*, *Plant Phys.* 129, 1568-1580.
- Inada, N. & Wildermuth, M.C. (2005) Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of *Arabidopsis* mature leaf. *Planta*, 211, 9-16.
- Isaacson, T.; Kosma, D.K.; Matas, A.J.; Buda, G.J.; He, Y.; Yu, B.; Pravitasari, A.; Batteas, J.D.; Stark, R.A.; Jenks, M.A.; Rose, J.K.C. (2009) Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J.*, 60, 363-377.
- Jalan, N.; Kumar, D.; Yu, F.; Jones, J.B.; Graham, J.H.; Wang, N. (2013). Complete genome sequence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain A^w12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. *Genome Announc.* 1(3):e00235-13. doi:10.1128/genomeA.00235-13.
- Javelle, M.; Vernoud, V.; Rogowsky, P.M.; Ingram, G.C. (2011) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol.*, 189, 17-39.
- Jeffree, C.E. (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. En: *Plant cuticles, an integrated and functional approach*; Editor: Kersteins G; Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 33-82.
- Jetter, R.; Kunst, L.; Samuels, A.L. (2006) Composition of plant cuticular waxes. En: *Biology of the Plant Cuticle*; Editores: Riederer, M. & Muller, C.; Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, pp. 145-181.
- Jones, J.D. & Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Kannangara, R.; Branigan, C.; Liu, Y.; Penfield, T.; Rao, V.; Mouille, G.; Hofte, H.; Pauly, M.; Riechmann, J.L.; Broun, P. (2007). The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 19, 1278-1294.
- Kerk, N.M.; Ceserani, T.; Tausta, S.L.; Sussex, I.M.; Nelson, T.M. (2003) Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiol.*, 132, 27-35.

- Khalaf, A.A.; Gmitter Jr., F.G.; Conesa, A.; Dopazo, J.; Moore, G.A. (2011) *Fortunella margarita* transcriptional reprogramming triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. BMC Plant Biology, 11,159.
- Khalaf, A.A.; Moore, G.A.; Jones, J.B.; Gmitter Jr., F.G. (2007) New insights into the resistance of Nagami kumquat to canker disease. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 71, 240-250.
- Kim, T.H.; Park, J.H.; Kim, M.C.; Cho, S.H. (2008) Cutin monomer induces expression of the rice OsLTP5 lipid transfer protein gene. *J. Plant Physiol.*, 165, 345-349.
- Koizumi, M. (1979) Ultrastructural changes in susceptible and resistant plants of citrus following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 45, 635-644.
- Koizumi, M. (1985) Citrus canker: The world situation. En: *Citrus Canker: An International Perspective*; Editor: Timmer, L.W; Citrus Research & Education Center, University of Florida, Lake Alfred, pp. 2-7.
- Kolattukudy, P.E.; Rogers, L.M.; Li, D.; Hwang, C.S.; Flaishman, M.A. (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4080-4087.
- Koornneef, M.; Hanhart, C.J.; Thiel, F. (1989) A genetic and phenotypic description of eceriferum (cer) mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.*, 80, 118-22.
- Köppen, W. (1936). *Das geographische System der Klimate*. En: *Handbuch der Klimatologie*; Editores: Köppen, W & Geiger, R., Verlag von Gebrüder Borntraeger, Berlin, pp. 1-44.
- Kosma, D.K.; Bourdenx, B.; Bernard, A.; Parsons, E.P.; Lü, S.; Joubès, J.; Jenks, M.A. (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 151, 1918-1929.
- Kunst, L. & Samuels, L. (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr. Opin. in Plant Biol.*, 12, 721-727.
- Lai, M.L.; Moreira, L.M.; Dezajacomo, J.; Brigati, J.B.; Ferreira, C.B.; Ferro, M.I.; Silva, A.C.; Oliveira, J.C.; Ferro, J.A. (2009) New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiol.*, 9, 12.
- Lee, I.J.; Kim, K.W.; Hyun, J.W.; Lee, Y.H.; Park, E.W. (2009) Comparative ultrastructure of nonwounded Mexican Lime and Yuzu leaves infected with the citrus canker bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Microsc. Res. Techniq.*, 72, 507-516.
- Leite Jr., R.P. & Mohan, S.K. (1990) Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Prot.*, 9, 3-7.
- Leite Jr., R.P.; Mohan, S.K.; Pereira, A.L.G.; Campacci, C.A. (1987) Integrated control of citrus canker: effect of genetic resistance and application of bactericides. *Fitopatol. Bras.*, 12, 257-263.
- Li, Y.; Beisson, F.; Koo, A.J.K.; Molina, I.; Pollard, M.; Ohlrogge, J. (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18339-18344.
- Lindow, S.E. & Brandl, M.T. (2003) *Microbiology of the Phyllosphere*. *Appl. and environ. Microbiol.*, 69, 1875-1883.
- Liu, D.C.; Zeng, Q.; Ji, q.X.; Liu, C.F.; Liu, S.B.; Liu, Y. (2012) A comparison of the ultrastructure and composition of fruits cuticular wax from the wild-type 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck cv. Newhall) and its glossy mutant. *Plant Cell Rep.* DOI 10.1007/s00299-012-1333-x.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lovera, C.L.; Favaro, M.A.; Ribero, G.G.; Pilatti, R.; Rista, L.M.; Marano, M.R.; Gariglio, N.F. (2012) Efecto de diferentes productos cúpricos y métodos de aplicación sobre la incidencia y

- severidad de canchros de los cítricos en naranja dulce cv. 'Lanelate' en la zona centro-este de Santa Fe, Argentina. XX Jornadas de Jovens pesquisadores da AUGM (Asociación de Universidades de Grupo Montevideo), Curitiba, Brasil.
- Malamud, F.; Torres, P.S.; Roeschlin, R.; Rigano, L.A.; Enrique, R.; Bonomi, H.R.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R.; Vojnov, A.A. (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology*, 157, 819-829.
- Marcell, L.M. & Beattie, G.A. (2002) Effect of leaf surface waxes on leaf colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Mol. Plant Micr. Interact.*, 15, 1236-1244.
- Matas, A.J.; Agustí, J.; Tadeo, F.R.; Talón, M.; Rose, J.K.C. (2010) Tissue-specific transcriptome profiling of the citrus fruit epidermis and subepidermis using laser capture microdissection. *J. Exp. Bot.*, 61, 3321-3330.
- Medina, C.L.; Machado, E.C.; Gomes, M.M.A. (1999) Condutância estomática, transpiração e fotossíntese de laranja Valência sob deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11, 29-34.
- Melotto, M.; Underwood, W.; He, S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 101-122.
- Melotto, M.; Underwood, W.; Koczan, J.; Nomura, K.; He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126, 969-980.
- Micheloud, N.G. 2013. Comportamiento fenológico reproductivo de variedades en la zona centro de la provincia de Santa Fe. Tesis de Maestría en Cultivos Intensivos. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Micheloud, N.G.; Pilatti, R.A.; Gariglio, N.F. (2011) Efecto de la fecha de poda sobre la brotación, la intensidad de floración y el cuajado de frutos en mandarina, cv. 'Clemenules', en la zona central de Santa Fe. XXXIV Congreso Argentino de Horticultura, Buenos Aires, Argentina.
- Millar, A.A. & Kunst, L. (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.*, 12, 121-131.
- Millar, A.A.; Clemens, S.; Zachgo, S.; Giblin, E.M.; Taylor, D.C.; Kunst, L. (1999) CUT1, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell*, 11, 825-838.
- Montillet, J.-L. & Hirt, H. (2013). New checkpoints in stomatal defense. *Trends Plant Sci.*, 18, 295-297.
- Moreira, L.M.; Almeida, N.F.; 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, J.B.; Kitajima, E.W.; Laia, M.L.; Leite, R.P.; Nishiyama, M.Y.; Rodrigues Neto, J.; Nociti, L.A.; Norman, D.J.; Ostroski, E.H.; Pereira, H.A.; Staskawicz, B.J.; Tezza, R.I.; Ferro, J.A.; Vinatzer, B.A.; Setubal, J.C. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* ssp. *aurantifolii*. *BMC Genomics*, 1, 238.
- Mueller, O.; Lightfoot, S.; Schroeder, A. (2004) RNA Integrity Number (RIN)- Standardization of RNA Quality control. Tech. Rep. 5989-1165EN, Agilent Technologies, Application Note.
- Nawrath, C. 2006. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 281-7.
- Nelson, T.; Tausta, S.L.; Gandotra, N.; Liu, T. (2006) Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 181-201.
- Nesbitt, M.L.; Ebel, L.C.; Dozier Jr., W.A. (2008) Production Practices for Satsuma Mandarins in the Southeastern United States. *HortScience*, 43, 290-292.

- Njombolwana, N.S.; Erasmus, A.; van Zyl, J.G.; du Plooy, W.; Cronje, P.J.R.; Fourie, P.H. (2013) Effects of citrus wax coating and brush type on imazalil residue loading, green mould control and fruit quality retention of sweet oranges. *Postharvest Biol. Technol.*, 83, 362-371.
- Nomura, K.; Melotto, M.; He, S.Y. (2005) Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 361-368.
- Ollitrault, P.; Terol, J.; Chen, C.; Federici, C.T.; Lotfy, S.; Hippolyte, I.; Ollitrault, I.; Bérard, A.; Chauveau, A.; Cuenca, J.; Costantino, G.; Kacar, Y.; Mu, L.; Garcia-Lor, A.; Froelicher, Y.; Aleza, P.; Boland, A.; Billot, C.; Navarro, L.; Luro, F.; Roose, M.L.; Gmitter, F.G.; Talon, M.; Brune, D. (2012) A reference genetic map of *C. clementina* hort. Ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics*, 13, 593.
- Palacios, J. 2005. *Citricultura*; Talleres Gráficos Alfa-Beta, Buenos Aires, Argentina, 518 pp.
- Palou, L.; Jacas, J.A.; Marcilla, A.; Alonso, M.; del Río, M.A. (2008) Physico-chemical and sensory quality of 'Clemenules' mandarins and survival of the Mediterranean fruit fly as affected by complementary cold and carbon dioxide quarantine treatments. *Postharvest Biol. Technol.*, 48, 443-450.
- Park, J.H.; Suh, M.C.; Kim, T.H.; Kim, M.C.; Cho, S.H. (2008) Expression of glycine rich protein genes, AtGRP5 and AtGRP23, induced by the cutin monomer 16-hydroxypalmitic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 1015-1018.
- Parsek, M.R. & Fuqua, C. (2004) Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.*, 186, 4427-4440.
- Peña, L. & Navarro, L. (1999) Transgenic citrus. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Trees*; Editor: Bajaj, Y.P.S.; Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 39-53.
- Perren, R.A. (2008) Cultivos frutihortícolas no tradicionales en la provincia de Santa Fe. Información económica para la gestión. XXXI Congreso Argentino de Horticultura, Mar del Plata, Argentina.
- Pilatti, R.A.; Dovis, V.L.; Gariglio, N.F.; Buyatti, M.; Micheloud, N. (2009) Efecto de la fertilización foliar con Nitrógeno sobre la floración, el establecimiento de frutos y el rendimiento en cítricos. *Revista FAVE, Sección Ciencias Agrarias*, 8, 19-28.
- Podila, G.K.; Rogers, L.M.; Kolattukudy, P.E. (1993) Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.*, 103, 267-272.
- Pollard, M.; Beisson, F.; Li, Y.; Ohlrogge, J.B. (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.*, 13, 236-246.
- Preston, G.M.; Studholme, D.J.; Caldelari, I. (2005) Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 331-360.
- Pruvost, O.; Boher, B.; Brocherieux, C.; Nicole, M.; Chiroleu, F. (2002) Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. *Phytopathology*, 92, 336-346.
- Raffaële, S.; Vailliau, F.; Leger, A.; Joubes, J.; Miersch, O.; Huard, C.; Blee, E.; Mongrand, S.; Domergue, F.; Roby, D. (2008) A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 752-767.
- Raffaële, S.; Leger, A.; Roby, D. (2009) Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signal. Behav.*, 4, 94-99.
- Rashotte, A.; Jenks, M.; Ross, A.; Feldmann, K. (2004) Novel *eceriferum* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219, 5-13.
- Reina-Pinto, J.J. & Yephremov, A. (2009) Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.*, 47, 540-549.

- Reisige, K.; Gorzelanny, C.; Daniels, U.; Moerschbacher, B.M. (2006) The C28 aldehyde octacosanal is a morphogenetically active component involved in host plant recognition and infection structure differentiation in the wheat stem rust fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 68, 33-40.
- Riederer, M. & Markstädter, C. (1996) Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. En: *Plant cuticles, an integrated and functional approach*; Editor: Kersteins, G.; Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 33-82.
- Riederer, M. & Schneider, G. (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta*, 180, 154-165.
- Rigano, L.A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendín, L.; Filippone, P.; Torres, P.S.; Qüesta, J.; Dow, J.M.; Castagnaro, A.P.; Vojnov, A.A.; Marano, M.R. (2007) Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20, 1222-1230.
- Rowland, O.; Zheng, H.; Hepworth, S.R.; Lam, P.; Jetter, R.; Kunst, L. (2006) CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 142, 866-877
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 545 pp.
- Samuels, L.; Kunst, L.; Jetter, R. (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 683-707.
- Schaad, N.C.; Postnikova, E.; Lacy, G.H.; Sechler, A.; Agarkova, I.; Stromberg, P.E.; Stromberg, V.K.; Vidaver, A.K. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29, 690-695.
- Schaad, N.W.; Postnikova, E.; Lacy, G.H.; Sechler, A.; Agarkova, I.; Stromberg, P.E.; Stromberg, V.K.; Vidaver, A.K. (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* ssp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* ssp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* ssp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* ssp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* ssp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* ssp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28, 494-518.
- Schnable, P.S.; Hochholdinger, F.; Nakazono, M. (2004) Global expression profiling applied to plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 50-56.
- Schnurr, J.; Shockley, J.; Browse, J. (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 629-642.
- Schreiber, L.; Krimm, U.; Knoll, D.; Sayed, M.; Auling, G.; Kroppenstedt, R.M. (2005) Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol.*, 166, 589-594.
- Schubert, T.S.; Rizvi, S.A.; Sun, X.; Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Dixon, W.N. (2001) Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida again. *Plant Dis.*, 85, 340-356.
- Schumann, G.L. & D'Arcy, C.J. 2006. *Essential Plant Pathology*; APS Press, Minnesota, USA, 338 pp.
- Sendín, L.N.; Filippone, M.P.; Orce, I.G.; Rigano, L.; Enrique, R.; Peña, L.; Vojnov, A.A.; Marano, M.R.; Castagnaro, A.P. (2012) Transient expression of pepper *Bs2* gene in *Citrus limon* as an approach to evaluate its utility for management of citrus canker disease. *Plant Pathol.*, 61, 648-657.

- Serizawa, S. & Inoue, K. (1975) Studies on citrus canker III. The influence of wind on infection. Bulletin of the Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station, 11, 54-67.
- Shibutani, M.; Uneyama, C.; Miyazaki, K.; Toyoda, K.; Hirose, M. (2000) Methacarn Fixation: A novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. Lab. Invest., 80, 199-208.
- Shiotani, H.; Fujikawa, T.; Ishihara, H.; Tsuyumu, S.; Ozaki, K. (2007) A pthA homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. J. Bacteriol., 189, 3271-3279.
- Shiotani, H.; Uematsu, H.; Tsukamoto, T.; Shimizu, Y.; Ueda, K.; Mizuno, A.; Sato, S. (2009) Survival and dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from infected Satsuma mandarin fruit. Crop Prot., 28, 19-23.
- Shiotani, H.; Yoshioka, T.; Yamamoto, M.; Matsumoto, R. (2008) Susceptibility to citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* depends on the nuclear genome of the host plant. J. Gen. Plant Pathol., 74, 133-137.
- Stall, R.E. & Civerolo, E.L. (1991) Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. Ann. Rev. Phytopat., 29, 399-420.
- Stall, R.E. & Seymour, C.P. (1983) Canker: A threat to citrus in the Gulf Coast states. Plant Dis., 67, 581-585.
- Stall, R.E.; Civerolo, E.L.; Ducharme, E.P.; Krass, C.J.; Poe, S.R.; Miller, J.W.; Schoulties, C.L. (1987) Management of citrus canker by eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. En: Plant Pathogenic Bacteria; Editores: Civerolo, E.L.; Collmer, A.; Davis, R.E.; Gillaspie, A.G.; Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 900-905.
- Stall, R.E.; Marcó, G.M.; Canteros, B.I. (1982) Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of citrus. Phytopathology, 72, 1097-1100.
- Stall, R.E.; Miller, J.W.; Canteros, B.I. (1980) Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. Proc. Fla. State Hortic. Soc., 93, 10-14.
- Stark, R.E. & Tian, S. (2006) The cutin biopolymer matrix. En: Biology of the Plant Cuticle; Editores: Riederer, M.; Muller, C.; Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, pp. 126-141.
- Stein, B.; Ramallo, J.; Foguet, L.; Graham, J.H. (2007) Citrus leafminer control and copper spray for management of citrus canker on lemon in Tucumán, Argentina. Proc. Fla. State Hortic. Soc., 120, 127-131.
- Stover, E.; Castle, W.; Chao, C-C. (2005) Trends in U.S. sweet orange, grapefruits and mandarin type cultivars. HortTechnology, 15, 501-506.
- Strittmatter, C. (1979) Modificación de una técnica de coloración safranina-fast green . Bol. Soc. Argent. Bot., 18, 121-122.
- Sturaro, M.; Hartings, H.; Schmelzer, E.; Velasco, R.; Salamini, F.; Motto, M. (2005) Cloning and characterization of GLOSSY1, a maize gene involved in cuticle membrane and wax production. Plant Physiol., 138, 478-489.
- Stuurman, N.; Pacios Bras, C.; Schlaman, H.R.; Wijffjes, A.H.; Bloemberg, G.; Spaink, H.P. (2000) Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. Mol. Plant Microbe Interact., 13, 1163-1169.
- Sun, X; Stall, R.E.; Jones, J.B.; Cubero, J.; Graham, J.H.; Dixon, W.N.; Schubert, T.S.; Chalowx, P.H. (2004) Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. Plant Dis., 88, 1179-1188.
- Tadeo, F.R.; Iglesias, D.J.; Talón, M. ;Primo Millo, E. (2003). Histología y Citología de los cítricos; Generalitat Valenciana, Serie de Divulgación Técnica Nro. 54, 99 pp.

- Tafolla-Arellano, J.C.; González-León, A.; Tiznado-Hernández, M.E.; Zacarías García, L.; Báez-Sañudo, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev. Fitotecnia mexicana*, 36, 3-12.
- Takahashi, H.; Kamakura, H.; Sato, Y.; Shiono, K.; Abiko, T.; Tsutsumi, N.; Nagamura, Naoko, Y.; Nishizawa, K.; Nakazono, M. (2010) A method for obtaining high quality RNA from paraffin sections of plant tissues by laser microdissection. *J. Plant Res.*, 123, 807-813.
- Tang, D.; Simonich, M.T.; Innes, R.W. (2007) Mutations in LACS2, a long-chain acyl- coenzyme A synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 144, 1093-1103.
- Teixeira, D.C.; Saillard, C.; Couture, C.; Martins, E.C.; Wulff, N.A.; Eveillard-Jagoueix, S.; Yamamoto, P.T.; Ayres, A.J.; Bove, J.M. (2008) Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol. Cell Probes*, 22, 139-150.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 351-357.
- Timmer, L.W.; Brlansky, R.H.; Davis, C.L.; Howd, D.S.; Contrera, J. (1991) Xylem limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. *Phytopathology*, 81, 1212.
- Timmer, L.W.; Garnsey, S.M.; Graham, J.H. (2000) *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd ed; APS Press, 92 pp.
- Untergrasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 40:e115.
- Vernière C.; Hartung, J.S.; Pruvost, O.P.; Civerolo, E.L.; Alvarez, A.M.; Maestri, P.; Luisetti, J. (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104, 477-487.
- Vernière, C.J.; Gottwald, T.R.; Pruvost, O. (2003) Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. *Phytopathology*, 93, 832-843.
- Viloria, Z.; Drouillard, D.L.; Graham, J.H.; Grosser, J.W. (2004) Screening triploid hybrids of 'Lakeland' limequat for resistance to citrus canker. *Plant Dis.*, 88, 1056-1060.
- Vogg, G.; Fischer, S.; Leide, J.; Emmanuel, E.; Jetter, R.; Levy, A.A.; Riederer, M. (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. *J. Exp. Bot.*, 55, 1401-1410.
- Vojnov A. & Marano M.R. (2014) Biofilm formation and virulence in bacterial plant pathogens. En: *Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria*; Editores: Wang, N.; Jones, J.; Sundin, G.; White, F.; Hogenhout. S.; Roper, C.; De La Fuente, L.; Ham, J.H., APS Press (*en prensa*).
- Vojnov, A.A.; Morais do Amaral, A.; Dow, J.M.; Castagnaro, A.P.; Marano, M.R. (2010) Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 467-477.
- Wang, J.; Hao, H.; Liu, R.; Ma, Q.; Xu, J.; Chen, F.; Cheng, Y.; Deng, X. (2014) Comparative analysis of surface wax in mature fruits between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression. *Food Chem.*, 153, 177-185.
- Wang, Y.; Fua, X.Z.; Liua, J.H.; Hong, N. (2011) Differential structure and physiological response to canker challenge between 'Meiwa' kumquat and 'Newhall' navel orange with contrasting resistance. *Sci. Hortic.*, 128, 115-123.

- Whipps, J.M.; Hand, P.; Pink, D.; Bending, G.D. (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1744-1755.
- Woloshuk, C.P. & Kolattukudy, P.E. (1986) Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *lisi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1704-1708.
- Xiao, F.; Goodwin, S.M.; Xiao, Y.; Sun, Z.; Baker, D.; Tang, X.; Jenks, M.A.; Zhou, J.M. (2004) *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development, *EMBO J.*, 23, 2903-2913.
- Xu, Q.; Chen, L-L.; Ruan, X.; Chen, D.; Zhu, A.; Chen, C.; Bertrand, D.; Jiao, W-B.; Hao, B-H.; Lyon, M.P.; Chen, J.; Gao, S.; Xing, F.; Lan, H.; Chang, J.W.; Ge, X.; Lei, Y.; Hu, Q.; Miao, Y.; Wang, L.; Xiao, S.; Biswas, M.K.; Zeng, W.; Guo, F.;1, Cao, H.; Yang, X.; Xu, X-W.; Cheng, Y-J.; Xu, J.; Liu, J-H.; Luo, O.J.; Tang, Z.; Guo, W-W.; Kuang, H.; Zhang, H-Y.; Roose, M.L.; Nagarajan, N.; Deng, X-X.; Ruan, Y. (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet.*, 45, 59-68.
- Yang, W.; Simpson, J.P.; Li-Beisson, Y.; Beisson, F.; Pollard, M.; Ohlrogge, J.B. (2012) A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant Physiol.*, 160, 638-652.
- Yeats, T.H. & Rose, J.K.C. (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.*, 163, 5-20.
- Yeats, T.H.; Martin, L.B.; Viart, H.M.; Isaacson, T.; He, Y.; Zhao, L.; Matas, A.J.; Buda, G.J.; Domozych, D.S.; Clausen, M.H.; Rose, J.K.C. (2012) The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat. Chem. Biol.*, 8, 609-611.
- Yun, M.H.; Torres, P.S.; El Oirdi, M.; Rigano, L.A.; Gonzalez-Lamothe, R.; Marano, M.R.; Castagnaro, A.P.; Dankert, M.A.; Bouarab, K.; Vojnov, A.A. (2006) Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol.*, 141, 178-187.
- Zheng, H.; Rowland, O.; Kunst, L. (2005) Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell*, 17, 1467-1481.
- Zubrzycki, H.M. & Diamante de Zubrzycki, A. (1987) Relationship between the amount of inoculum and the infection caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on citrus seedlings through natural infections in the field. *Proc. of International Soc. of Citriculture*, 1, 379-382.