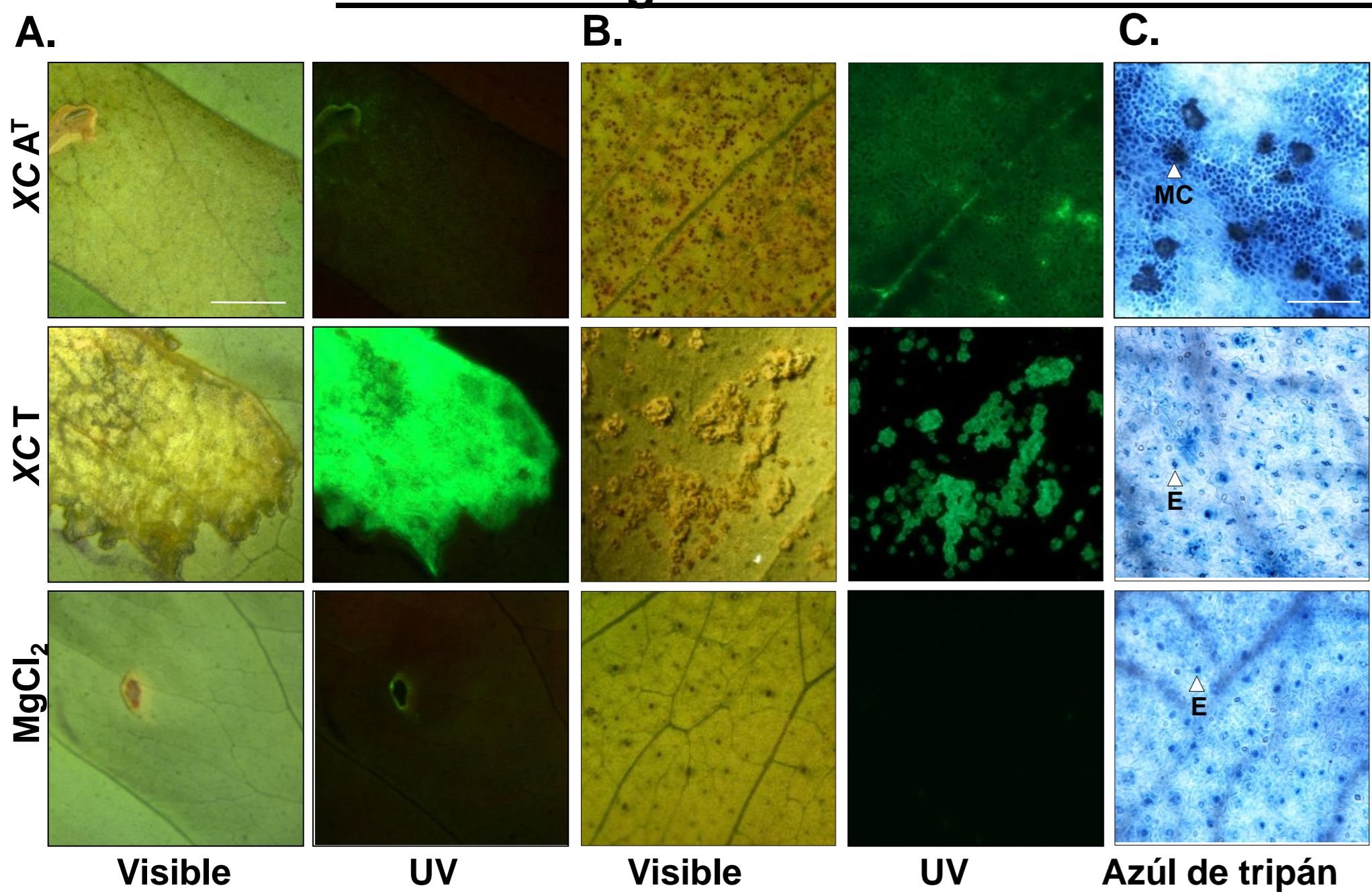


Una nueva variante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* reduce el desarrollo del cancro cítrico

Roxana A. Roeschlin¹; María Amalia Chiesa¹; María Alejandra Favaro¹; María Paula Filippone²; Atilio Castagnaro²; Frederick G. Gmitter Jr.³; José Gadea Vacas⁴; María Rosa Marano¹.

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. ² Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITA-NOA); (EAAOC)-CONICET. ³ Universidad de Florida (IFAS), Citrus Research and Education Center Lake Alfred - U.S.A. ⁴ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia - España

Sintomatología desarrollada durante la interacción XC AT-limonero



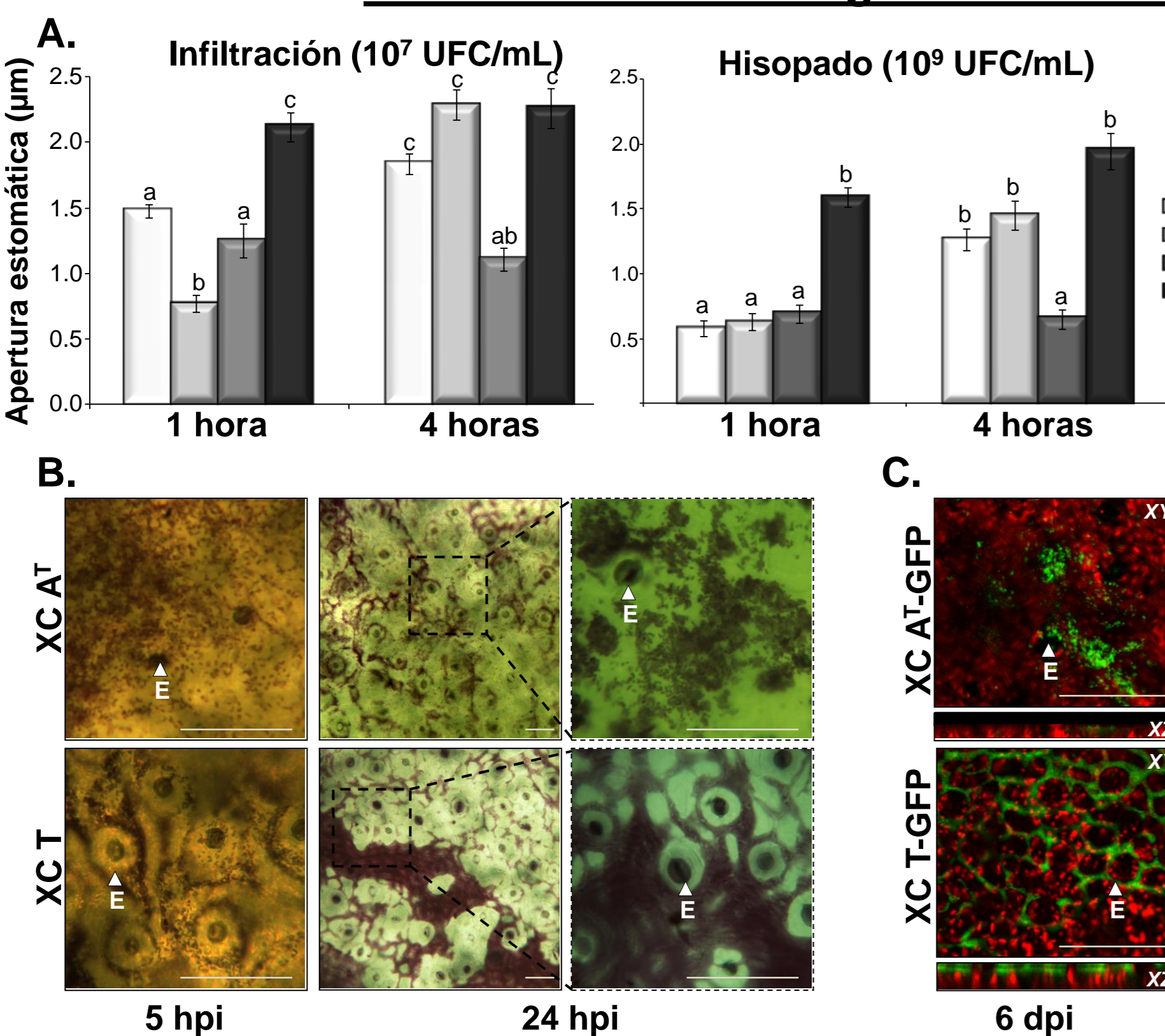
Síntomas desarrollados a los 16 días post inoculación (dpi) en la cara abaxial de hojas de limonero inoculadas con XC AT y XC T (cepa de referencia) transformadas con GFP (proteína verde fluorescente) utilizando dos metodologías de infección: **A**, infiltración (10^7 ufc/ml) y **B**, hisopado (10^9 ufc/ml). Los síntomas fueron observados con lupa bajo luz visible y UV (Escala, 10mm). **C**. Muerte celular en hojas de limonero inoculadas por hisopado. 48 hpi, hojas de limonero fueron teñidas con azul de tripán y observadas microscópicamente. Escala, 150µm; MC, muerte celular; E, estoma.

Categorización funcional de los transcritos involucrados en estrés biótico

| Procesos biológicos – Hisopado | XC AT (FDR) | XC T (FDR) | Procesos biológicos- Infiltración | XC AT (FDR) | XC T (FDR) |
|---|-------------|------------|---|-------------|------------|
| Biosíntesis de flavonoides | 3.62E-04 | n.s. | Metabolismo de lignina | 1.10E-07 | n.s. |
| Respuesta a ácido salicílico | 2.47E-03 | n.s. | Deposición de calosa en la pared celular | 1.54E-02 | n.s. |
| Respuesta a ácido jasmónico | 1.03E-02 | n.s. | Procesos apoptóticos | 2.81E-02 | n.s. |
| Metabolismo de glucosinolatos | 1.60E-02 | n.s. | Metabolismo de especies reactivas del oxígeno | 4.70E-02 | n.s. |
| Catabolismo de peróxido de hidrógeno | n.s. | 1.81E-04 | Señalización mediada por etileno | n.s. | 1.52E-03 |
| Modificación de la pared celular | n.s. | 1.40E-02 | Respuesta de defensa a bacterias | 8.66E-09 | 5.69E-08 |
| Desenrollamiento del ADN | n.s. | 2.84E-02 | Respuesta inmune | 2.50E-08 | 1.52E-03 |
| Respuesta a bacterias | 1.60E-08 | 7.47E-07 | Respuesta a ácido salicílico | 6.46E-06 | 6.61E-06 |
| Metabolismo de lignina | 2.62E-03 | n.s. | Respuesta a ácido abscísico | 3.02E-04 | 3.06E-05 |
| Respuesta a auxina | 9.19E-03 | n.s. | Respuesta a ácido jasmónico | 7.17E-04 | 2.88E-04 |
| Señalización mediada por receptores de superficie | n.s. | 2.94E-06 | Respuesta a auxina | 1.04E-05 | n.s. |
| Respuesta inmune | n.s. | 3.19E-02 | Procesos apoptóticos | n.s. | 1.30E-03 |
| Señalización mediada por ácido abscísico | n.s. | 3.66E-02 | Señalización mediada por receptores tirosin-quinasa | 6.85E-04 | 1.10E-02 |
| Muerte celular | 2.25E-05 | 9.80E-04 | | | |

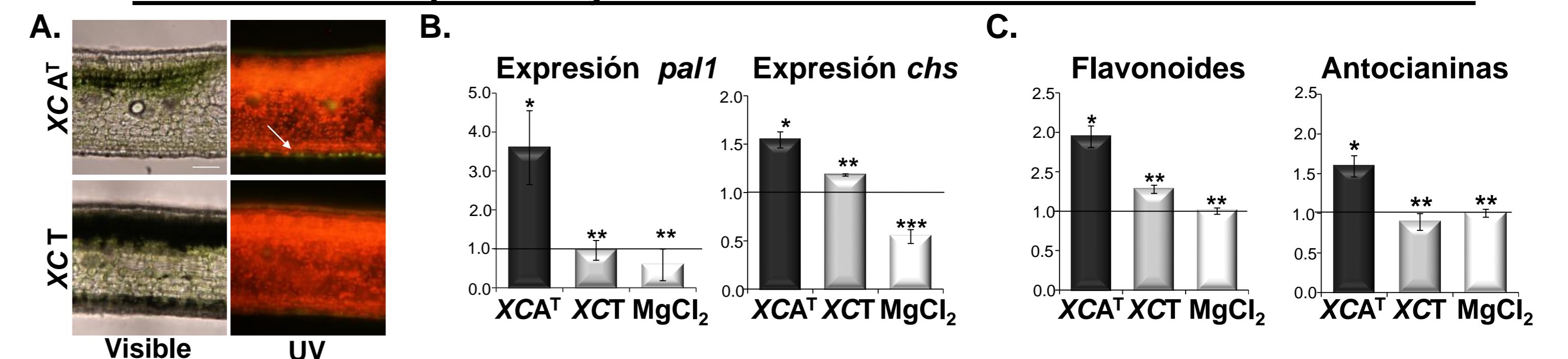
Análisis bioinformático utilizando el programa FatiGO (www.babelomics.bioinfo.cipf.es) y ortólogos de *Arabidopsis*. FDR: False Discovery Rate. n.s.: no significativo. Los recuadros en verde y rojo representan genes inducidos y reprimidos.

Caracterización biológica de la interacción XC AT-limonero

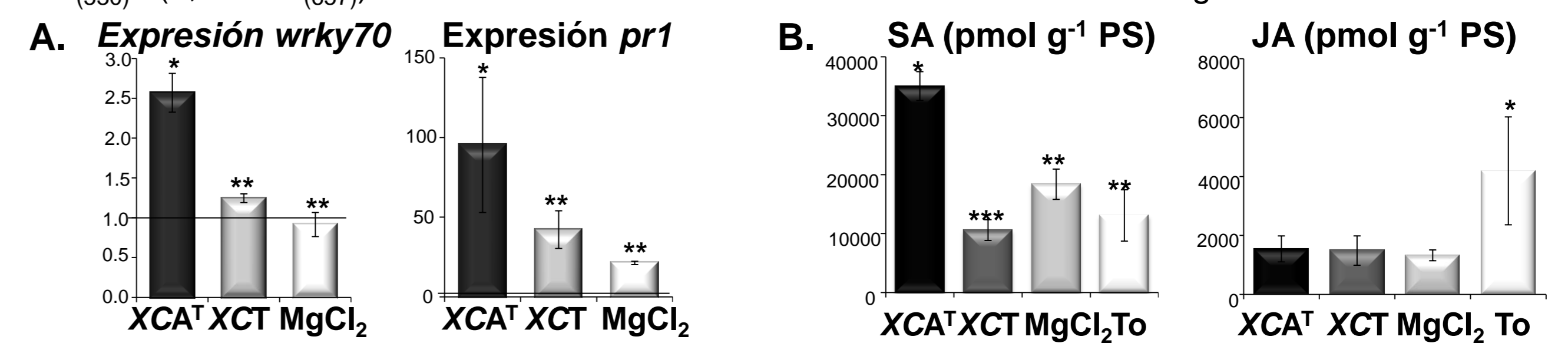


A. Movimiento estomático en la superficie abaxial de hojas de limonero. Luego de 1 y 4 hpi, impresiones del tejido epidérmico se observaron microscópicamente. Los datos marcados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$). **B**. Adherencia bacteriana en la superficie abaxial de hojas de limonero utilizando cristal violeta a 5 y 24 hpi. Las células teñidas adheridas a la superficie de la hoja fueron analizadas microscópicamente. **C**. Formación de biofilm observada por microscopía laser confocal a los 6 dpi. La fluorescencia en rojo representa la autofluorescencia de la clorofila; la fluorescencia en verde corresponde a las bacterias transformadas con GFP. XY y XZ son las imágenes proyectadas de los ejes XY y XZ. Escala, 50 µm; E, estoma.

Análisis transcriptómico y metabolómico de la interacción XC AT-limonero

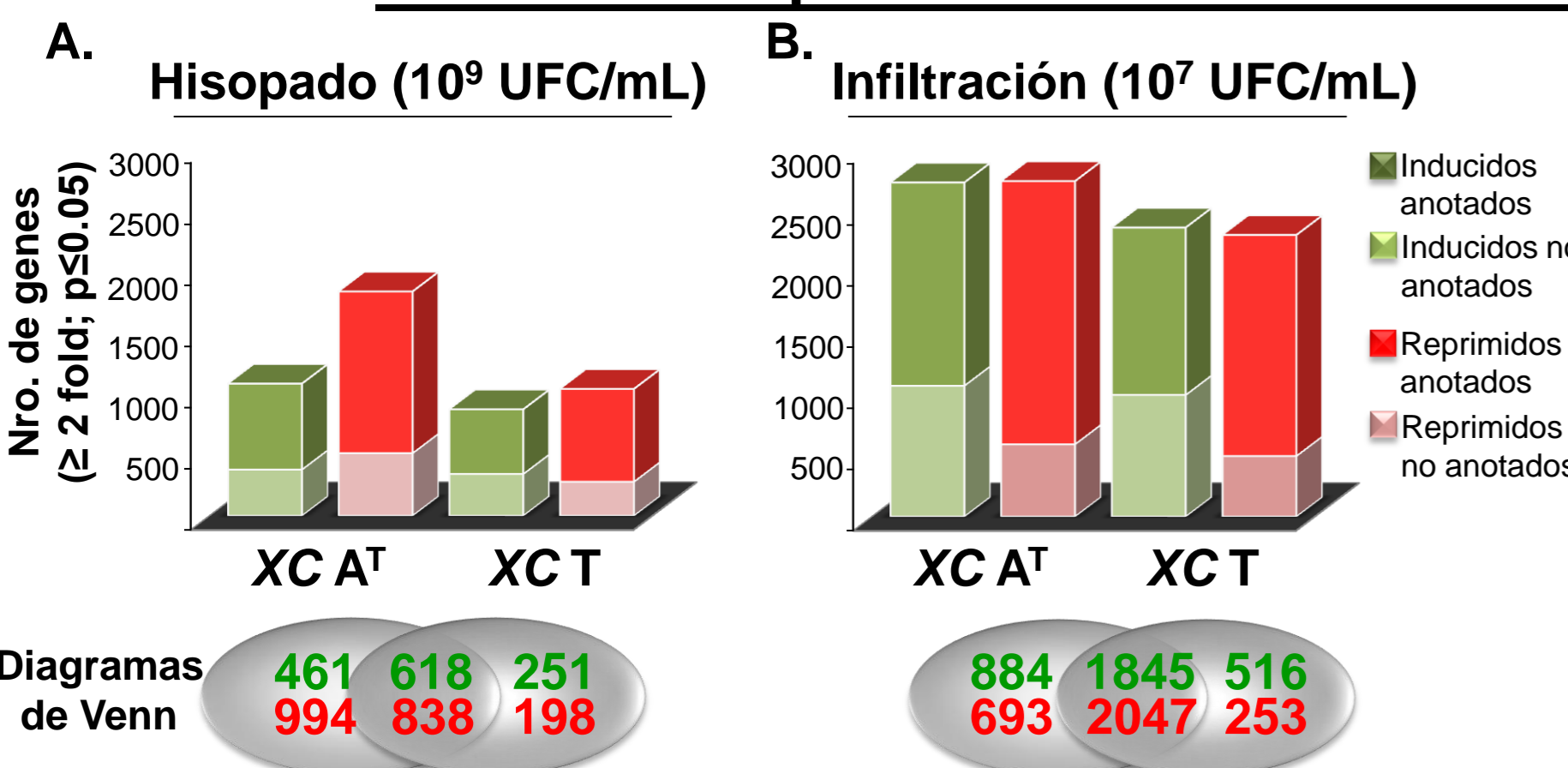


A. Imágenes microscópicas del tejido vegetal y autofluorescencia de compuestos fenólicos en hojas inoculadas por hisopado. La flecha indica la fluorescencia debida a compuestos fenólicos. **B**. qRT-PCR de *pal1* y *chs* relativos a histona. La expresión fue comparada con To (muestra de referencia). **C**. Determinación del contenido fenólico en hojas de limonero. La medidas de absorbancia de los flavonoides se realizó a 310nm, mientras que el nivel de antocianinas se evaluó a través de: $Abs_{anthocyanins} = Abs_{(530)} - (0,25 Abs_{(657)})$. Los datos marcados con diferentes asteriscos son significativamente diferentes ($p < 0.05$).



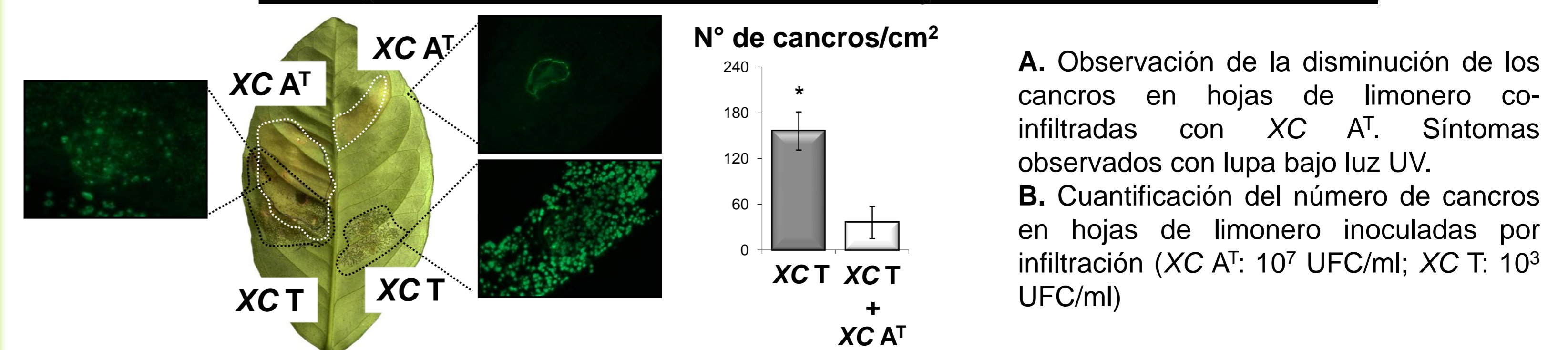
A. qRT-PCR de *wrky70* y *pr1* relativos a *histona*. La expresión fue comparada con To (muestra de referencia). **B**. Cuantificación de las hormonas ácido salicílico y jasmónico en hojas de limonero mediante LC-MS. PS: peso seco. Los datos marcados con diferentes asteriscos son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Perfil transcriptómico de Citrus limon en respuesta a XC AT y XC T



Análisis de la respuesta transcriptómica a *Xanthomonas citri* en hojas de limonero utilizando microarreglos de *Citrus* (Agilent). Expresión diferencial de genes evaluados a las 48 hpi en hojas de limonero inoculadas con XC AT y XC T comparadas con una muestra de referencia (To) utilizando: **A**. hisopado; **B**. infiltración. Las barras y los números coloreados en verde y rojo representan los genes inducidos y reprimidos, respectivamente. Las barras más oscuras representan los genes de *Citrus* que poseen un ortólogo en *Arabidopsis*.

La respuesta inmune de XC AT disminuye la formación de cáncros



A. Observación de la disminución de los cáncros en hojas de limonero co-infiltradas con XC AT. Síntomas observados con lupa bajo luz UV. **B**. Cuantificación del número de cáncros en hojas de limonero inoculadas por infiltración (XC AT: 10^7 UFC/ml; XC T: 10^3 UFC/ml).

Conclusiones:

- ✓ XC AT induce una respuesta tipo hipersensible en limonero caracterizada por la acumulación de metabolitos secundarios como flavonoides y antocianinas junto con el incremento de ácido salicílico. Esta respuesta inmune es capaz de disminuir el desarrollo del cancro cítrico en hojas de limonero y controlar el desarrollo de la enfermedad.
- ✓ Comprender los mecanismos genéticos y moleculares de la defensa inducida por XC AT permitirá desarrollar estrategias biotecnológicas para el manejo de la cancrrosis bacteriana de los cítricos.

Agradecimientos: * Préstamo BID PICT 2011 N° 1833. * Citrus Research and Education Center, University of Florida (Contrato UF1150 y UF13089).