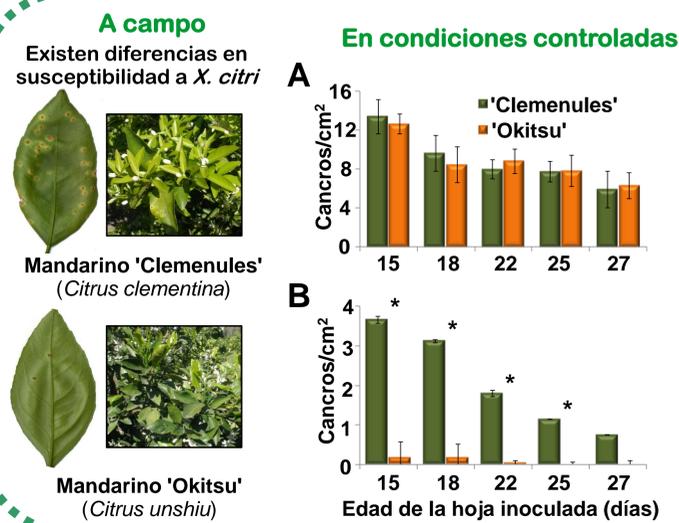


Las barreras de defensa primarias del mandarina 'Okitsu' son la principal causa de la resistencia a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

M. A. Favaro^{1,2}; R. A. Roeschlin¹; P. M. Yaryura³; A. Vojnov³; L. M. Rista²; J. Gadea⁴; N. F. Gariglio²; M. R. Marano¹

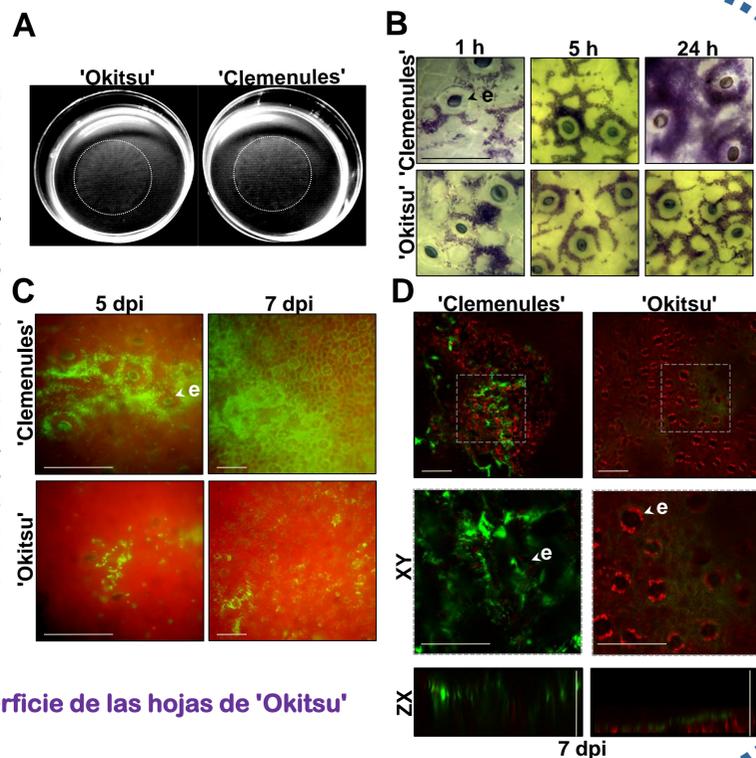
¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Argentina; ²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina; ³Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. Cesar Milstein, Fundación Pablo Cassará; ⁴Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP), España.



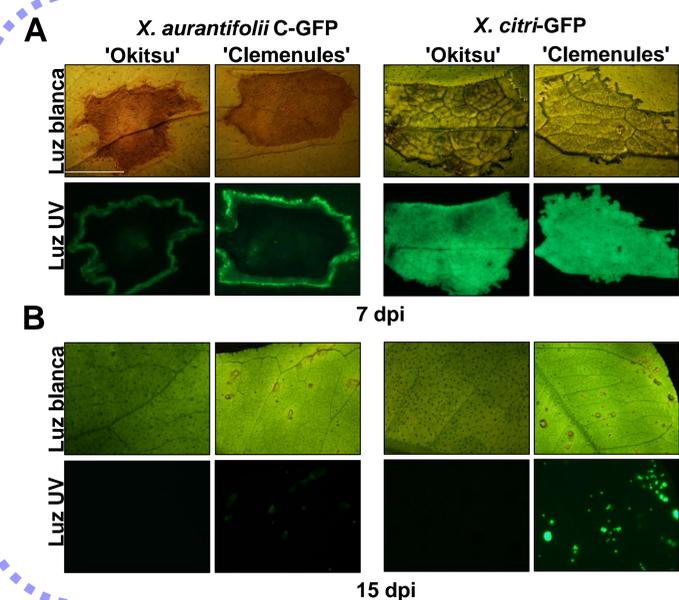
Pruebas de patogenicidad de *X. citri* en hojas de mandarin. Bajo condiciones controladas se seleccionaron brotes nuevos de aproximadamente 1 cm de tamaño y con al menos 5 hojas. Cada hoja del brote seleccionado, comenzando por la más alejada del ápice, fue inoculada a los 15, 18, 22, 25 y 27 días de edad, respectivamente. Las suspensiones bacterianas se inocularon en las hojas usando dos métodos: **A-** Infiltración y **B-** Aspersión, 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, $P < 0,05$.

La resistencia a cancris se quiebra cuando las hojas de 'Okitsu' son inoculadas por infiltración con *X. citri*

Análisis del crecimiento epifítico y la formación de biofilm de *X. citri* en mandarina. **A-** Quimiotaxis de *X. citri* evaluada en extractos de hojas. El diámetro e intensidad del halo de turbidez desarrollado determina la quimiotaxis bacteriana en los extractos. **B-** Adherencia de *X. citri* a la superficie abaxial de hojas de 18 días de edad evidenciada por el uso de cristal violeta. **C-** Crecimiento epifítico de *X. citri* transformada con GFP en hojas de 18 días asperjadas con la bacteria y monitoreadas con microscopio de fluorescencia. **D-** Formación de biofilm de *X. citri*-GFP en hojas de 18 días 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. Barras: 50 μ m. e: estoma; dpi: días post-inoculación.



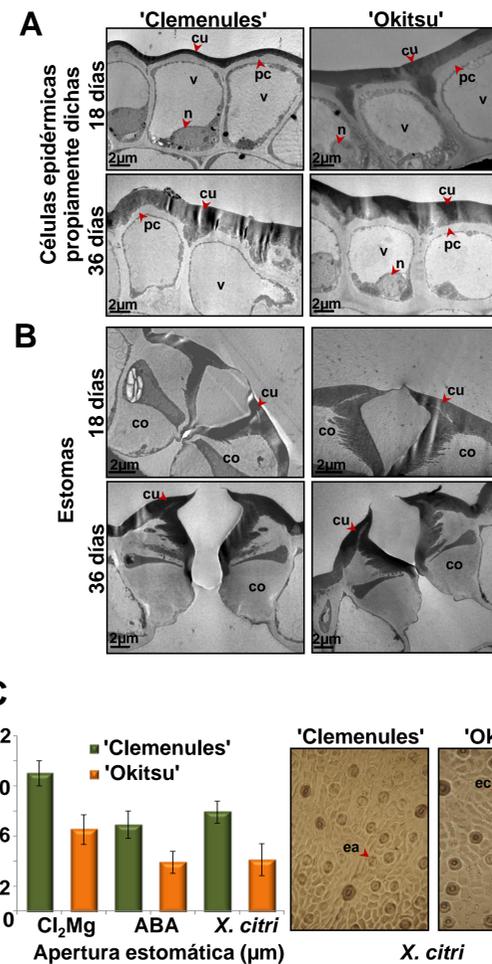
***X. citri* no forma biofilm sobre la superficie de las hojas de 'Okitsu'**



La superficie de las hojas de 'Okitsu' influye 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 *X. citri* transformadas con GFP. Las suspensiones bacterianas se prepararon en Cl_2Mg 10 mM y se inocularon en la cara abaxial de las hojas mediante dos métodos diferentes: **A-** Infiltración. **B-** Aspersión. Las hojas se fotografiaron bajo lupa con luz blanca y luz UV (520 nm), respectivamente. Barra: 10 mm.

Las barreras de defensa primarias de 'Okitsu' también protegen del ingreso de la cepa avirulenta *X. aurantifolii* tipo C

El desarrollo más rápido de la cutícula de la hoja de 'Okitsu' podría contribuir a la resistencia a *X. citri*



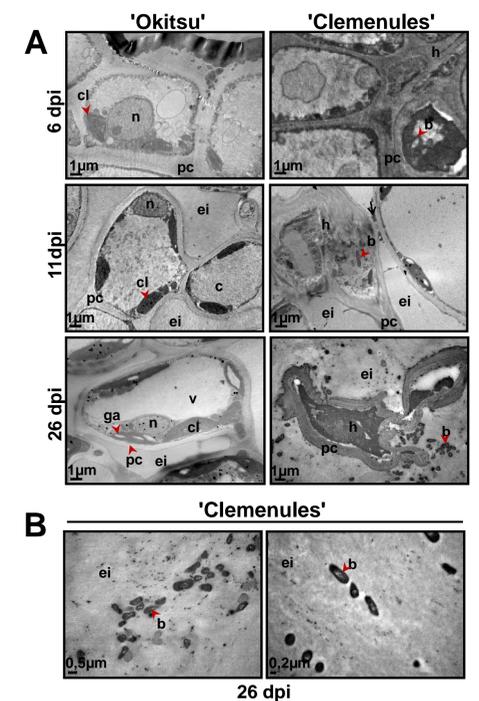
Características de las barreras primarias en diferentes estados de desarrollo de las hojas. **A-** Células epidérmicas observadas con microscopía electrónica de transmisión (MET). **B-** Células oclusivas de los estomas, observadas con MET. cu: cutícula; pc: pared celular; n: núcleo; v: vacuola; co: célula oclusiva. **C-** Apertura estomática 4 horas post-tratamiento. Fotos representativas de hojas inoculadas con *X. citri*. ABA: ácido abscísico; ea: estoma abierto; ec: estoma cerrado.

La cutícula de las hojas de 'Clemenules' presenta mayor cantidad de alcanos de cadena larga

Metabolito	Ratio Okitsu/Clemenules
Ácidos grasos C16	1,18
Ácidos grasos C18	0,94
Alcano C16	0 *
Alcano C18	1,70
Alcano C26	0 *
Alcano C28	0 *
Alcano C29	0 *

Caracterización metabólica de la cutícula. Se evaluó la composición en hojas de 18 días a través de GC-masa. Se muestra el ratio de los metabolitos principales. Los datos marcados con asterisco difieren significativamente entre ambos cultivares de acuerdo al test t de Student, $P < 0,05$.

***X. citri* no induce cambios ultraestructurales en hojas de 'Okitsu' inoculadas por aspersión**



Cambios estructurales inducidos por *X. citri* en hojas de 18 días inoculadas por aspersión. **A-** A los 6 días post inoculación (dpi) la morfología de las células de 'Okitsu' es normal, mientras que en 'Clemenules' se observan pocas bacterias comenzando a proliferar en los espacios intercelulares. A los 11 días dpi se observa colapso de células y presencia de bacterias en 'Clemenules'. A los 26 dpi las alteraciones estructurales se han incrementado en 'Clemenules' y la hipertrofia e invasión bacteriana es evidente. **D-** Detalle de bacterias proliferando en el apoplasto de 'Clemenules' 26 dpi. cu: cutícula; pc: pared celular; n: núcleo; v: vacuola; cl: cloroplasto; ei: espacio intercelular; ga: gránulos de almidón; b: bacteria; hipertrofia.

Conclusiones

- Las barreras de defensa primarias del cv. 'Okitsu' son la principal causa de la resistencia a *X. citri*.
- El menor período de susceptibilidad a *X. citri* de los brotes de 'Okitsu' permite reducir el número de aplicaciones de bactericidas cúpricos, contribuyendo al manejo integrado de la enfermedad.
- La identificación de los genes y de las vías metabólicas que aceleran el desarrollo de la cutícula en 'Okitsu' contribuirá al desarrollo de estrategias biotecnológicas para desarrollar cultivares resistentes a *X. citri*.

Agradecimientos

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2011-1833
Citrus Research and Education Center, University of Florida (Contrato UF1150 y UF13089).