

Rol del xantano en la formación de biopelículas durante la vida epifítica de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* y su relación con el desarrollo del cancro

Luciano A. Rigano*, Florencia Siciliano**, Ramón Enrique**, Lorena N. Sendín***, María P. Filippone***, Pablo S. Torres*, Julia Qüesta**, J. Maxwell Dow****, Atilio P. Castagnaro***, Adrián A. Vojnov* y María R. Marano**

RESUMEN

La mayoría de las bacterias fitopatógenas viven de forma epifítica sobre las plantas antes de la colonización y sobreviven en la superficie del tejido del hospedante, mediante la formación de biopelículas. La capacidad para producir exopolisacáridos es crítica para la formación de las mismas en diversas bacterias. En este trabajo, se estudió la formación de biopelículas de *X. citri* subsp. *citri*, bacteria responsable de la cancrrosis de los cítricos, y su relación con la supervivencia epifítica y el desarrollo del cancro sobre hojas de plantas de limonero. Mediante tinción con cristal violeta y análisis de microscopía confocal de barrido láser, se observó que *X. citri* subsp. *citri* forma estructuras de biopelículas sobre hojas de limonero. En contraste, una cepa mutante defectiva en la biosíntesis del exopolisacárido xantano, denominada *X. citri* subsp. *citri gumB*, fue incapaz de formar dichas estructuras y su supervivencia epifítica y capacidad de desarrollar la enfermedad en la planta se vieron comprometidas. Estos resultados sugieren que la formación de biopelículas tiene una importancia clave en la fase epifítica de *X. citri* subsp. *citri* antes y durante el desarrollo del cancro.

Palabras clave: *Citrus limon*, exopolisacáridos, cancrrosis, microscopía confocal de barrido láser, gen *gumB*.

ABSTRACT

Role of xanthan in biofilm formation during *Xanthomonas citri* subsp. *citri* epiphytic life and its relationship to canker development

Almost all phytopathogenic bacteria have an epiphytic life before invading the host plant. These bacteria survive on the surface of the host tissue through biofilm formation. The ability to produce exopolysaccharides is critical for biofilm formation in several phytopathogenic bacteria. In this work, biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (bacterium responsible for citrus canker disease), and its relationship to epiphytic survival and canker development on lemon leaves were studied. Through crystal violet staining and confocal laser scanning microscopy analysis, it was observed that *X. citri* subsp. *citri* forms biofilm structures on lemon leaves. Furthermore, a *X. citri* subsp. *citri gumB* mutant strain, defective in production of exopolysaccharide xanthan, did not form a structured biofilm and showed reduced growth and survival on leaf surfaces, and reduced disease symptoms. These results suggest that biofilm formation has an important role in *X. citri* subsp. *citri* epiphytic survival prior to canker development.

Key words: *Citrus limon*, exopolysaccharides, citrus canker, confocal laser scanning microscopy, *gumB* gene.

*Fundación Pablo Cassará, Centro de Ciencia y Tecnología "Dr. Cesar Milstein", Buenos Aires, R. Argentina. marano@ibr-conicet.gov.ar

** Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-Conicet), Área Virología, Departamento Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

*** Sección Biotecnología, EEAOC-Conicet, Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (Itanoa).

**** Biomerit Research Centre, Department of Microbiology, National University of Ireland, Cork, Ireland.

INTRODUCCIÓN

La formación de biopelículas es fundamental en el ciclo de vida de muchos microorganismos. Las bacterias forman biopelículas cuando perciben una superficie, se adhieren a ella y, a continuación, elaboran señales químicas para coordinar la diferenciación y formación de estructuras, incluyendo la de una cubierta polisacárida protectora (Scott and Manning, 2003). Si bien la composición de la biopelícula es variable según el sistema de que se trate, en general su componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (EPS), proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Branda *et al.*, 2005; Southey-Pillig *et al.*, 2005; Steinberger and Holden, 2005; Sutherland, 2001).

Se demostró que las biopelículas protegen a las bacterias del estrés ambiental, de los mecanismos de defensa del hospedero y de los compuestos antimicrobianos (Branda *et al.*, 2005; Camilli and Bassler, 2006; Parsek and Fuqua, 2004), por lo que no es sorprendente que estén correlacionadas con la virulencia en numerosas bacterias (Fujishige *et al.*, 2006; Laue *et al.*, 2006). Se ha encontrado una asociación entre la formación de biopelículas y la virulencia para una variedad de infecciones bacterianas crónicas en humanos (Parsek and Singh, 2003). Sin embargo, hay pocos estudios sobre el rol de la formación de biopelículas en el desarrollo de enfermedades bacterianas en plantas (Crossman and Dow, 2004; Koutsoudis *et al.*, 2006). La mayoría de las bacterias fitopatógenas viven de forma epifítica sobre las plantas antes de la colonización y el progreso de la enfermedad está directamente relacionado con el tamaño de la población epifítica del patógeno, la que a su vez depende de su capacidad para producir biopelículas (Hirano and Upper, 1983).

En la constitución de las biopelículas, se pueden diferenciar tres etapas: la primera es la de adhesión a la superficie, que se produce generalmente mediante apéndices bacterianos como los flagelos. Una vez que la adhesión es irreversible, comienza la segunda etapa, la etapa de crecimiento: las bacterias se dividen formando una microcolonia. Durante esta etapa, se produce la síntesis de exopolisacáridos que forman la matriz de la biopelícula, la que progresivamente toma una conformación tridimensional. Cuando la biopelícula ha alcanzado la madurez se produce la tercera etapa, en la que algunas células se liberan de la matriz para colonizar nuevas superficies.

La capacidad para producir EPS es crítica para la formación de biopelículas en diversas bacterias fitopatógenas. La composición de los EPS varía según la bacteria y las condiciones ambientales en las que estas se

encuentren. Las bacterias del género *Xanthomonas* producen el xantano, un EPS constituido por unidades repetitivas de pentasacáridos con la estructura manosa-(β -1,4)-ácido glucurónico-(β -1,2)-manosa-(α -1,3)-celobiosa (Jansson *et al.*, 1975).

X. citri subsp. *citri*, responsable de la cancrrosis de los cítricos, produce lesiones corchosas típicas denominadas "cancros" (Brunings and Gabriel, 2003), que constituyen la principal fuente de propagación de la enfermedad (Cubero and Graham, 2004). En este trabajo, se investigó la formación de biopelículas por parte de *X. citri* subsp. *citri* y su posible rol en la supervivencia epifítica y desarrollo del cancro. Se demostró que *X. citri* subsp. *citri* forma estructuras de biopelículas sobre las hojas de los cítricos. En contraste, una cepa mutante defectiva en la biosíntesis de xantano fue incapaz de formar estructuras de biopelículas y se vio comprometida en su supervivencia epifítica y en su capacidad de desarrollar síntomas en plantas, por lo que se infiere que la formación de biopelículas sería importante en la fase epifítica de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se aisló la cepa salvaje de *X. citri* subsp. *citri* de hojas de limonero con síntomas típicos de cancrrosis, en el laboratorio de la Sección Fitopatología de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). Las cepas se cultivaron a 28°C en medio nutritivo PYM: peptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l y extracto de malta 3 g/l (Siciliano *et al.*, 2006). Para los análisis de formación de biopelículas, se criaron las bacterias en medio mínimo, que contenía glucosa (1% p/v) como fuente de carbono (Sherwood, 1970). Se midió el crecimiento bacteriano con un espectrofotómetro Spectronic 20GENesys (Termo Electron Corporation, Boston), a 600 nm. Los antibióticos kanamicina y gentamicina se utilizaron en concentraciones de 50 μ g/ml y 10 μ g/ml, respectivamente.

Obtención de una mutante de *X. citri* subsp. *citri* deficiente en la síntesis de xantano

Las técnicas moleculares utilizadas en este estudio se basaron en los protocolos descritos previamente (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN genómico de la cepa de *X. citri* subsp. *citri* se extrajo de acuerdo a Chen and Kuo (1993). Se amplificó un fragmento de 1457 pb a partir de la región que codifica los genes *gumB* y *gumC* (involucrados en la síntesis de xantano), usando el par de cebadores AGTTACGTGTTGGCGATCTTGGC (sentido) y AATGGCGTGCGGTCTCTTTC (antisentido), diseñados a partir de las secuencias de *X. citri* subsp. *citri* disponibles en GenBank (AE008923) (da Silva *et al.*, 2002). Cada reacción de PCR, de 50 μ l, estuvo compuesta por: 0,2 μ M de cada cebador; tampón de PCR 1x; 1,5 mM de MgCl₂;

0,2 mM de dNTPs; 75 ng de ADN y 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemania), usando las siguientes condiciones (35 ciclos): 95°C por 60 s, 63°C por 30 s y 72°C por 90 s. Todas las reacciones comenzaron con un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min y un único ciclo de extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Sambrook *et al.*, 1989). Las bandas correspondientes fueron purificadas a partir de gel, usando el "kit" de extracción de Qiaex II (Qiagen, Valencia, CA, USA), y fueron posteriormente clonadas en un vector pGEM-Teasy (Promega, Madison, WI, USA), para producir el plásmido pLR-XB. El fragmento *gumB-C* contiene un sitio de corte para la enzima de restricción *Bam*HI. El fragmento de 2 kb que contiene el casete *Kmr* (Ω) de pAZ (Ω) (amablemente proporcionado por la Dra. Ángeles Zorreguieta, de la Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, R. Argentina) fue insertado en el sitio de corte de *gumB*, *Bam*HI, generando una copia interrumpida del gen *gumB*. Estas construcciones fueron digeridas con *Not*I y subclonadas en un vector suicida, pJQ200KS (Muller *et al.*, 1993). El plásmido pSac-EPS generado fue introducido mediante electroporación en la cepa salvaje de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, siguiendo el protocolo descrito en Guilhabert *et al.* (2001). Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio nutritivo PYM solidificado con 1,5% (p/v) de agar, 50 μ g/ml de kanamicina y 5% de sacarosa (Muller *et al.*, 1993). La disrupción del locus *gumB* en la cepa mutante *gumB::Kmr* fue confirmado por PCR y Southern blot (dato no mostrado).

Evaluación de la producción de xantano

Para evaluar la producción de xantano, las cepas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (salvaje y mutante) fueron cultivadas en medio PYM suplementado con 2% de D-glucosa a 28°C por 24 h, con agitación. Se precipitó el EPS con etanol a partir del sobrenadante del cultivo, secándose y pesándose tal como se describe en Vojnov *et al.* (1998).

Material vegetal y ensayos de patogenicidad

Se utilizaron plantas de limón (*Citrus limon* (L.) Burm. f. cv. Eureka) de un año de edad, injertadas y mantenidas en invernadero bajo condiciones de temperatura y humedad controladas.

Para los ensayos de patogenicidad, se inocularon tres hojas de cada planta y tres plantas para cada cepa de *Xanthomonas*. Las inoculaciones se realizaron con suspensiones bacterianas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* salvaje, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* mutante y *Xanthomonas citri* subsp. *citri* mutante complementada con el plásmido pIZD15-261, que contiene la secuencia

completa del gen interrumpido en la mutante. La concentración bacteriana utilizada fue de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en $MgCl_2$ 10mM y los métodos de inoculación fueron: infiltración por presión, aspersión y herida más aspersión. Las plantas inoculadas se conservaron en cámaras de crecimiento durante 30 días, a 28°C, con humedad alta (>80% HR) y 16 h de luz de 150 μ E/sm² a 200 μ E/sm².

La evolución de los síntomas de la enfermedad fue monitoreada fenotípicamente en tres ensayos biológicos independientes y mediante curvas de crecimiento bacteriano.

Cuantificación de poblaciones bacterianas en plantas

Para la cuantificación de las poblaciones bacterianas, de cada planta se tomaron tres discos de 1 cm² de superficie de hojas inoculadas, como describen Siciliano *et al.* (2006). Los discos fueron sumergidos en 500 μ l de $MgCl_2$ 10mM, recuperándose las células bacterianas mediante maceración del tejido con un pequeño pilón plástico y agitación durante 5 min. Se realizaron diluciones seriales de la suspensión, sembrándose 100 μ l de cada dilución en placas de Petri que contenían PYM agar y luego se incubó a 28°C. Después de 48 h, se realizó el recuento de las UFC. La cuantificación se realizó una vez por semana. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para la determinación de la supervivencia epifítica, se aislaron las poblaciones bacterianas de acuerdo al método descrito por Morris *et al.* (1998). Las bacterias epifíticas fueron determinadas como se describió anteriormente, con la diferencia que los discos de hojas no se maceraron y solo fueron agitados suavemente durante 2 min a temperatura ambiente, para liberar solo las bacterias de la superficie de las hojas y no las bacterias del interior del apoplasto celular. La determinación se realizó diariamente durante siete días. Se utilizaron tres plantas para cada determinación y cada experimento se realizó por triplicado.

Estudios de adherencia bacteriana mediante tinción con cristal violeta

Para estudiar la adhesión bacteriana a las hojas de limonero, se cortaron discos de hojas sanas y se colocaron en placas de Petri, con la cara adaxial hacia abajo. Los discos fueron inoculados con cada una de las suspensiones de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (salvaje y mutante) a una concentración de 1×10^6 ufc/ml, siendo luego incubadas a 28°C durante 1, 3, 15 y 24 h.

La adhesión bacteriana fue revelada mediante tinción con cristal violeta, de la siguiente manera: una vez transcurrido el tiempo establecido, los discos de hojas se lavaron tres veces con H₂O destilada estéril y se calentaron a 60°C por 20 min, para permitir que el colorante se fijara a las bacterias. Posteriormente, las hojas se incubaron en

una solución de cristal violeta 30% (p/v), a temperatura ambiente durante 45 min. Los discos se lavaron tres veces con H₂O destilada estéril, para remover el exceso de colorante. Se analizó macroscópicamente el colorante adherido a las células bacterianas, que a su vez estaban unidas a la superficie de la hoja. La intensidad del color azul es directamente proporcional al número de bacterias adheridas.

Dinámica del desarrollo de la biopelícula

Para analizar la dinámica de la biopelícula, se usó un microscopio confocal invertido de barrido láser (CLSM: "inverted confocal laser scanning microscope"). Ambas cepas (*Xanthomonas citri* subsp. *citri* salvaje y mutante) fueron transformadas con el plásmido pMP2444, que codifica una proteína fluorescente verde (GFP) (Stuurman *et al.*, 2000). Las hojas de limonero fueron inoculadas por aspersión con la suspensión bacteriana de la cepa salvaje de *X. citri* subsp. *citri*, marcada con GFP, y con la cepa mutante *gumB::Km^r*. Las plantas fueron incubadas hasta que se formaron canchales en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para las observaciones, se cortaron áreas de hojas de 1 cm² y se montaron sobre el lado adaxial en un portaobjetos de vidrio.

RESULTADOS

Una cepa mutante de *X. citri* subsp. *citri* en el gen *gumB* es deficiente en la producción de xantano

Para investigar el rol del xantano en la formación de biopelículas, fue necesario crear una cepa mutante de *X. citri* subsp. *citri* deficiente en la producción del polisacárido. Esta se generó mediante mutagénesis de intercambio alélico, reemplazando el gen *gumB* funcional, necesario para la producción de xantano (Vojnov *et al.*, 1998) con un casete de resistencia a kanamicina (Km^r) (Ω), a través de recombinación homóloga.

Los cultivos de ambas cepas (mutante y salvaje) mostraron la misma cinética de crecimiento en medio PYM suplementado con 1% de glucosa (Figura 1 A), por lo que la mutante no manifestó pérdida de viabilidad. Con la purificación y cuantificación de los polisacáridos extracelulares del cultivo, se determinó que ambas bacterias sintetizan el xantano y lo liberan al medio como un polisacárido soluble. Sin embargo, se observaron grandes diferencias en la producción de EPS entre las cepas de *X. citri* subsp. *citri* salvaje (8,2 g/l) y la mutante *gumB* (0,15 g/l) (Figura 1 B). La complementación de la mutante *gumB* con el plásmido recombinante pIZD15-261, portador del grupo completo de genes *gum* de *X. campestris* pv. *campestris* (Vojnov *et al.*, 1998, 2002), restauró la producción de xantano al mismo nivel que *X. citri* subsp. *citri* salvaje (9,1 g/l).

El xantano es necesario para la adhesión de *X. citri* subsp. *citri* a la superficie de la hoja de limonero

La adhesión bacteriana a superficies bióticas fue evaluada por tinción con cristal violeta sobre discos de hojas sanas de limón durante 24 h. El número de bacterias adheridas en las hojas inoculadas con la cepa mutante *X. citri* subsp. *citri gumB* fue significativamente menor con respecto a las hojas inoculadas con *X. citri* subsp. *citri* salvaje a partir de las 15 h de incubación (Figura 2). No se

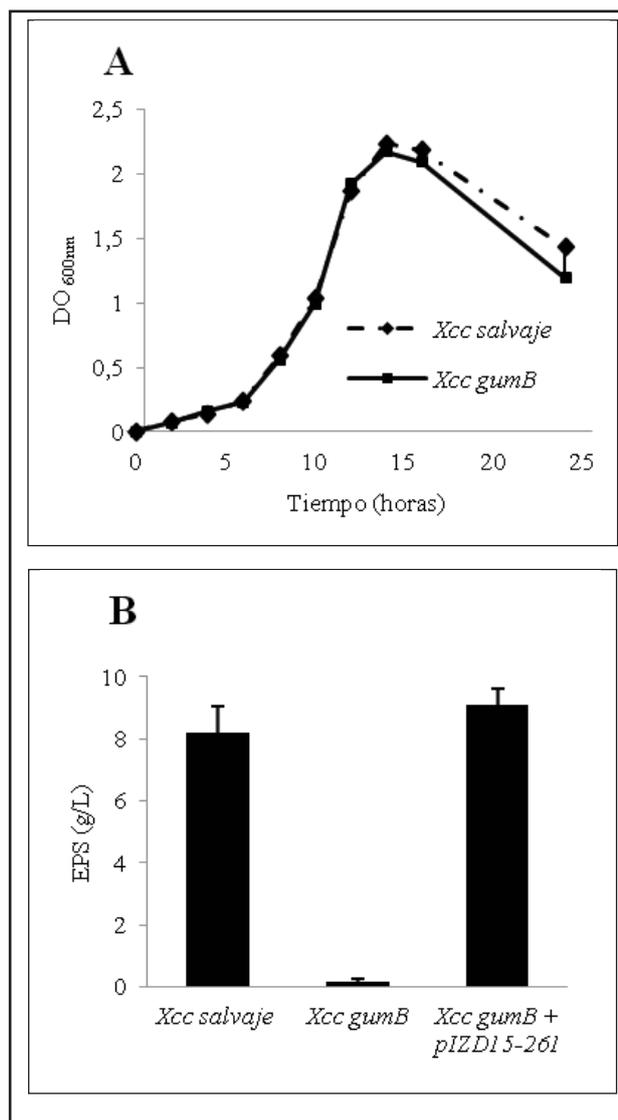


Figura 1. A) Cinética de crecimiento de cultivos líquidos de la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* salvaje y la mutante *gumB*. B) Xantano obtenido a partir de los sobrenadantes de cultivo de la cepa salvaje y mutante *gumB* luego de la precipitación con etanol. La cantidad de EPS producido por las cepas de *Xanthomonas* se expresa como g de xantano seco por litro de cultivo. El plásmido recombinante pIZD15-261, utilizado para complementar a la mutante de *Xcc gumB*, posee el "cluster" completo de genes *gum* de *X. campestris* pv. *campestris* 8004.

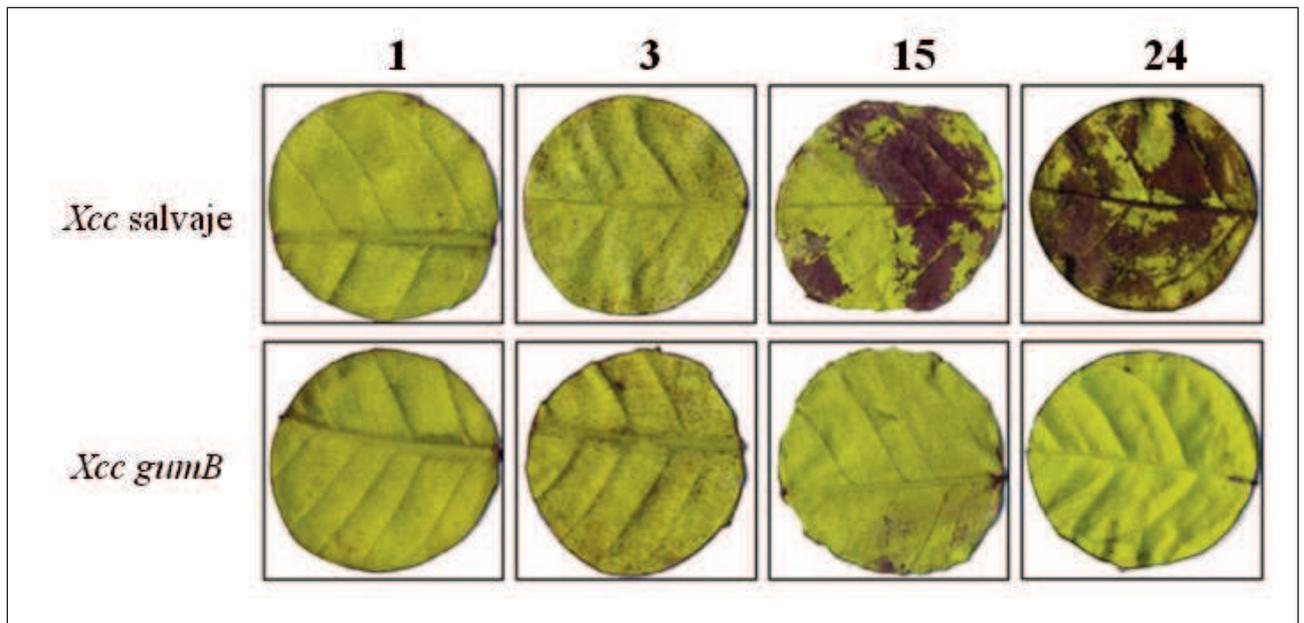


Figura 2. Adhesión bacteriana en hojas de limonero. La adhesión bacteriana y la formación de biopelículas en la cara abaxial de hojas de limonero fueron analizadas mediante tinción con cristal violeta luego de 1, 3, 15 y 24 h de incubación. Las células bacterianas adheridas a la superficie de la hoja se evaluaron macroscópicamente por la intensidad del color azul.

observaron diferencias significativas en la adhesión bacteriana entre *X. citri* subsp. *citri* salvaje y la mutante *gumB* complementada por el plásmido pZD15-261 (datos no mostrados).

Biopelícula y supervivencia epifítica en la interacción limonero-*X. citri* subsp. *citri*

El desarrollo de la enfermedad puede depender del grado de adhesión de la bacteria a la superficie de las hojas y de su capacidad para formar biopelículas. Esta última se evaluó mediante monitoreo por CLSM durante 25 días. Para este ensayo, se utilizó una cepa de *X. citri* subsp. *citri* portadora del gen GFP. A las 24 h después de la inoculación, se detectó fluorescencia sobre la superficie de las hojas y, a los seis días posteriores a la inoculación (d.p.i.), se distinguieron microcolonias y estructuras complejas, constituidas por capas múltiples de células en contacto unas con otras, predominantemente a través de interacciones laterales. Las células de la bacteria se adhirieron de forma horizontal y vertical, distribuidas al azar sobre las hojas de limonero (Figura 3 A). En contraste, las mutantes deficientes en xantano crecieron como células aisladas y no formaron microcolonias sobre las hojas durante todo el experimento, demostrando entonces que el xantano afecta la formación de agregados.

Para evaluar la influencia de la biopelícula sobre la supervivencia epifítica de la bacteria en las hojas, se realizó el conteo de células durante 10 d.p.i. A las 24 h de la inoculación, se observó que el crecimiento de la cepa mutante *gumB* disminuyó aproximadamente 100 veces con respecto al de la salvaje y a los 7 d.p.i., la diferencia en el

tamaño de ambas poblaciones bacterianas fue de los tres órdenes de magnitud (Figura 3 B).

El cancro de la hoja del limonero requiere de la formación de biopelículas para su desarrollo

Mediante la inoculación de hojas de limonero con suspensiones bacterianas, se observó que la capacidad de la mutante *gumB* para desarrollar síntomas de cancrrosis se vio severamente comprometida (Figura 4A). Las plantas tratadas con $MgCl_2$ no mostraron síntomas y la mutante *gumB* portadora del grupo de genes *gum* entero, clonado en pZD15-261, recuperó su fenotipo salvaje (datos no mostrados). El número de bacterias recuperadas de las hojas inoculadas no mostró diferencias significativas entre ambas cepas hasta los 14 d.p.i., punto en que la población de la mutante *gumB* comenzó a declinar hasta los 35 d.p.i., momento en que no se recuperó ninguna bacteria. En contraste, el crecimiento de la cepa salvaje fue de ocho órdenes de magnitud a las cinco semanas después de la inoculación (Figura 4B).

Para evaluar si la bacteria presentaba estructura de biofilm en el desarrollo del cancro, se monitorearon hojas de limonero inoculadas, mediante aspersión, con la cepa salvaje y la mutante *gumB* marcadas con GFP. Mediante CLSM, se observó que en las hojas inoculadas con la cepa salvaje (Figura 5), se habían formado agregados bacterianos con una estructura tridimensional y amplios espacios de agua, típicos de las estructuras de biopelículas. Estos agregados no se observaron con la bacteria mutante *gumB*, lo que sugiere que el EPS contribuye a la estructura interna de los cancrros.

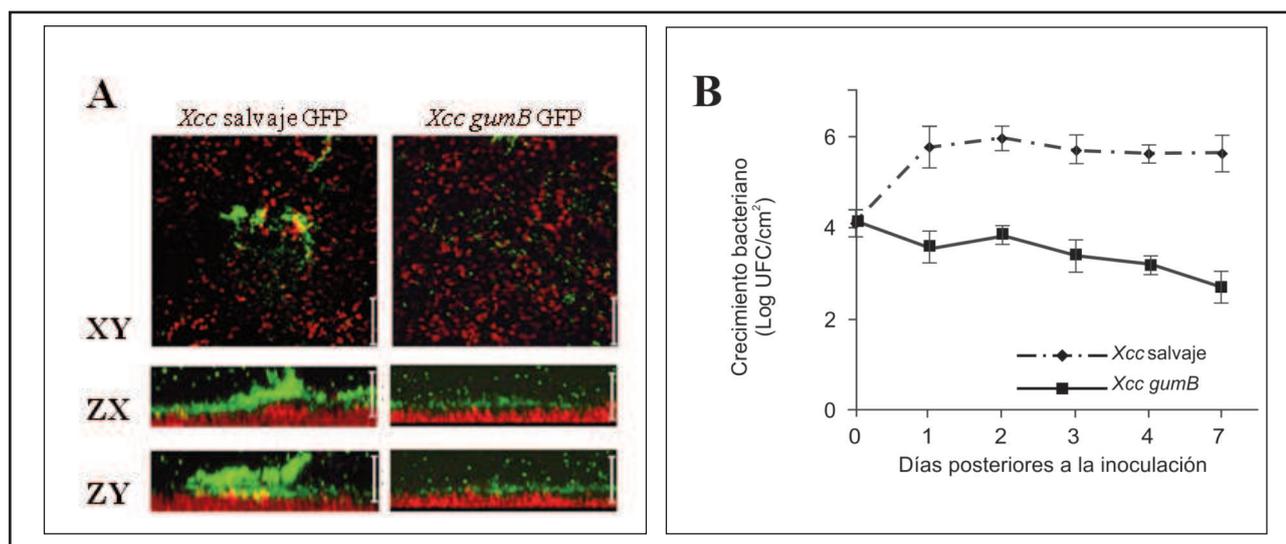


Figura 3. Desarrollo de biopelículas y crecimiento epifítico de *Xcc* sobre la hoja de limonero. **A)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal invertida de barrido láser de hojas inoculadas con *Xcc salvaje* y mutante *gumB* por aspersión. XY, ZX y ZY son proyecciones de las imágenes de los ejes XY, ZX y ZY, respectivamente. Barra de escala: 20 μ m. **B)** Crecimiento *in vivo* de la población epifítica de *Xcc salvaje* y mutante *gumB* en hojas de limonero. La población bacteriana fue cuantificada por maceración de discos de las hojas inoculadas en una solución 10 mM de MgCl₂ y plaqueo de diluciones seriadas. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar.

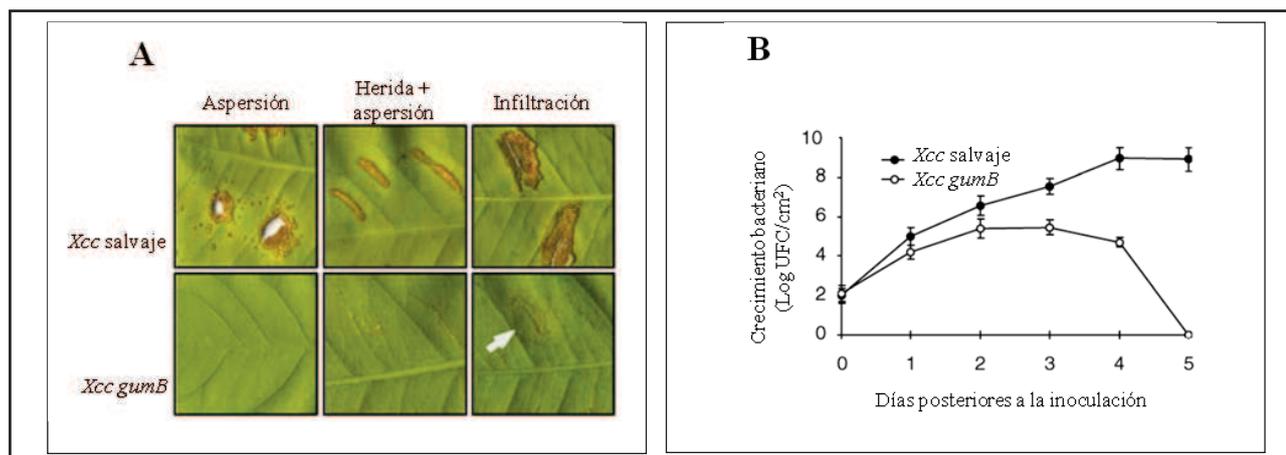


Figura 4. A) Cara abaxial de hojas de limonero inoculadas con *Xcc salvaje* y la bacteria mutante *gumB*. Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en una solución de 10 mM de MgCl₂ e inoculadas utilizando tres métodos diferentes de inoculación: aspersión, herida seguida de aspersión e infiltración. **B)** Crecimiento *in vivo* de las cepas de *Xcc* en hojas de limonero. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar.

DISCUSIÓN

En muchas bacterias, la síntesis de EPS se encuentra regulada por un complejo sistema de control. En *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, una de las bacterias más estudiadas del género, la biosíntesis del xantano está controlada por un grupo de 12 genes (*gumB* a *-M*) (Vojnov *et al.*, 1998, 2002). Los genes funcionales *gumB* y *gumC* son necesarios para la producción del xantano extracelular maduro a partir de los intermediarios pentasacáridos (Vojnov *et al.*, 1998). La comparación de los genomas de *X. citri* subsp. *citri* (cepa 306) (da Silva *et al.*, 2002) y *X. campestris* pv. *campestris* (cepa 8004) (Qian *et al.*, 2005) reveló que en ambas bacterias, el grupo de

genes *gum* mantiene su tamaño y orden, indicando esto que *X. citri* subsp. *citri* también puede ser capaz de producir xantano. La proteína GumB de *X. citri* subsp. *citri* (GenBank accession number: YP_242744) comparte el 92% de la identidad aminoacídica con la proteína GumB de *X. campestris* pv. *campestris* (GenBank accession number: YP_242744). Previamente, se demostró que la mutación del gen *gumB* en *X. campestris* pv. *campestris* tiene un efecto polar sobre la expresión de *gumB* y *gumC* y que la producción de xantano a partir de una unidad repetitiva de pentasacáridos requiere los productos de ambos genes (Vojnov *et al.*, 1998).

Nuestros resultados indican que el xantano de *X.*

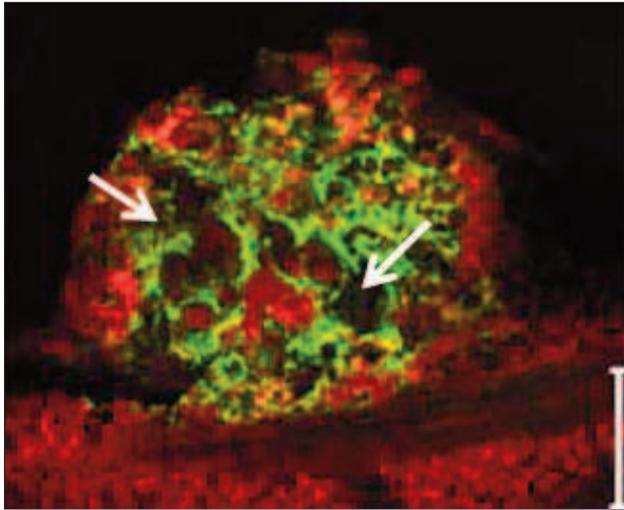


Figura 5. Fluorescencia emitida por *Xcc* salvaje-GFP en el interior de un cancro desarrollado sobre una hoja de limonero. La imagen fue capturada mediante microscopía confocal invertida de barrido láser y muestra la distribución de la bacteria dentro del cancro. Las flechas indican canales de agua. Barra de escala: 200 μ m.

citri subsp. *citri* juega un rol importante en la formación de biopelículas y en la supervivencia de la bacteria sobre la hoja. Se reconocieron los tres estados de desarrollo de la biopelícula: i) adhesión bacteriana, ii) formación de agregados y iii) formación de la biopelícula en el interior de las hojas colonizadas. Se demostró que el xantano es esencial para todo el proceso de formación de biopelículas, que presentan estructuras complejas en las que las bacterias se encuentran empaquetadas en arreglos hexagonales, separados por canales de agua (Figuras 2, 3 y 5). Se observaron fenotipos similares en la bacteria del suelo *Rhizobium leguminosarum* (Russo *et al.*, 2006).

La presencia de biopelículas está correlacionada con la patogenicidad de *X. citri* subsp. *citri*, la que fue severamente atenuada por la disrupción de un único gen involucrado en la biosíntesis de EPS, *gumB* (Figura 4). Existen referencias previas a la reducción de la virulencia de varias cepas de *Xanthomonas* mutantes que muestran deficiencias en la producción de xantano (Chou *et al.*, 1997; Kemp *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2006).

La colonización bacteriana también es necesaria para la expresión de genes asociados a la virulencia que inducen defensa vegetal (Marco *et al.*, 2005). El rol del xantano, tanto en la virulencia del patógeno como en la defensa del hospedante, puede explicar por qué se observaron poblaciones bacterianas epifíticas más pequeñas en la cepa mutante inoculada, en comparación con las poblaciones desarrolladas por la cepa salvaje (Figura 3 B). Sin embargo, no deben descartarse otras funciones del xantano en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, se demostró que el EPS es capaz de intervenir en la supresión de las respuestas de defensa

vegetal; así, se observó que el xantano induce la susceptibilidad a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*, ya que suprime la deposición de calosa en la célula vegetal, mecanismo que constituye una forma basal de defensa de las plantas frente a las colonizaciones bacterianas (Yun *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Para avanzar en el conocimiento de la dinámica de las interacciones *X. citri* subsp. *citri*-hospedero en el desarrollo de la enfermedad de la cancrrosis de los cítricos, se analizó la estructura de la biopelícula producida por *X. citri* subsp. *citri*. Estudios adicionales sobre la regulación espacial y temporal de la producción de xantano durante la evolución de la enfermedad, al igual que estudios para entender otros mecanismos regulatorios de la expresión de genes involucrados en la formación de biopelículas, podrían mejorar nuestro conocimiento sobre la adaptación de las bacterias a la vida parasítica dentro de las plantas. Tales conocimientos podrían proveer una base racional para el desarrollo de métodos de protección de los cultivos basados en la interferencia en procesos claves de la fase epifítica y en el desarrollo de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-02 no. 08-10740; PAV-137) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet, PIP6441). M. R. Marano, A. A. Vojnov y A. P. Castagnaro son miembros del Conicet. L. N. Sendín, L. Rigano y P. Torres fueron becarios de esta institución durante la realización de este trabajo. Se agradece a A. Zorreguieta por proveer el pAZ (Ω) y colaborar con la microscopía confocal.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Branda, S. S.; S. Vik; L. Friedman and R. Kolter. 2005.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13: 20-26.
- Brunings, A. M. and D. W. Gabriel. 2003.** *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4: 141-157.
- Camilli, A. and B. L. Bassler. 2006.** Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311: 1113-1116.
- Chen, W. P. and T. T. Kuo. 1993.** A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21: 2260.
- Chou, F. L.; H. C. Chou; Y. S. Lin; B. Y. Yang; N. T. Lin; S. F. Weng and Y. H. Tseng. 1997.** The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and

- virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233 (1): 265-269.
- Crossman, L. and J. M. Dow. 2004.** Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect.* 6: 623-629.
- Cubero, J. and J. H. Graham. 2004.** The leucine-responsive regulatory protein (Irp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2): 429-437.
- Da Silva, A. C.; J. A. Ferro; F. C. Reinach; C. S. Farah; L. R. Furlan; R. B. Quaggio; C. B. Monteiro-Vitorello; M. A. Van Sluys; N. F. Almeida; L. M. C. Alves; A. M. do Amara; M. C. Bertolini; L. E. A. Camargo; G. Camarotte; F. Cannavan; J. Cardozo; F. Chambergo; L. P. Ciapina; R. M. B. Cicarelli; L. L. Coutinho; J. R. Cursino-Santos; H. El-Dorry; J. B. Faria; A. J. S. Ferreira; R. C. C. Ferreira; M. I. T. Ferro; E. F. Formighieri; M. C. Franco; C. C. Greggio; A. Gruber; A. M. Katsuyama; L. T. Kishi; R. P. Leite; E. G. M. Lemos; M. V. F. Lemos; E. C. Locali; M. A. Machado; A. M. B. N. Madeira; N. M. Martinez-Rossi; E. C. Martins; J. Meidanis; C. F. M. Menck; C. Y. Miyaki; D. H. Moon; L. M. Moreira; M. T. M. Novo; V. K. Okura; M. C. Oliveira; V. R. Oliveira; H. A. Pereira; A. Rossi; J. A. D. Sena; C. Silva; R. F. de Souza; L. A. F. Spinola; M. A. Takita; R. E. Tamura; E. C. Teixeira; R. I. D. Tezza; M. Trindade dos Santos; D. Truffi; S. M. Tsai; F. F. White; J. C. Setubal and J. P. Kitajima. 2002.** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417 (6887): 459-463.
- Fujishige, N. A.; N. N. Kapadia; P. L. De Hoff and A. M. Hirsch. 2006.** Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 56 (2): 195-206.
- Guilhabert, M. R.; L. M. Hoffman; D. A. Mills and B. C. Kirkpatrick. 2001.** Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14 (6): 701-706.
- Hirano, S. S. and C. D. Upper. 1983.** Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21: 243-269.
- Jansson, P. E.; L. Kenne and B. Lindberg. 1975.** Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* 45: 275-282.
- Kemp, B. P.; J. Horne; A. Bryant and R. M. Cooper. 2004.** *Xanthomonas citri* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64: 209-218.
- Koutsoudis, M. D.; D. Tsaltas; T. D. Minogue and S. B. von Bodman. 2006.** Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (15): 5983-5988.
- Laue, H.; A. Schenk; H. Li; L. Lambertsen; T. R. Neu; S. Molin and M. S. Ullrich. 2006.** Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152: 2909-2918.
- Marco, M. L.; J. Legac and S. E. Lindow. 2005.** *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. *Environ. Microbiol.* 7 (9): 1379-1391.
- Morris, C. E.; J. M. Monier and M. A. Jacques. 1998.** A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (12): 4789-4795.
- Muller, P.; M. Keller; W. M. Weng; J. Quandt; W. Arnold and A. Puhler. 1993.** Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon: ExoY is homologous to sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6 (1): 55-65.
- Parsek, M. R. and C. Fuqua. 2004.** Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 186 (14): 4427-4440.
- Parsek, M. R. and P. K. Singh. 2003.** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 677-701.
- Qian, W.; Y. Jia; S. X. Ren; Y. Q. He; J. X. Feng; L. F. Lu; Q. Sun; G. Ying; D. J. Tang; H. Tang; W. Wu; P. Hao; L. Wang; B. L. Jiang; S. Zeng; W. Y. Gu; G. Lu; L. Rong; Y. Tian; Z. Yao; G. Fu; B. Chen; R. Fang; B. Qiang; Z. Chen; G. P. Zhao; J. L. Tang and C. He. 2005.** Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15 (6): 757-767.
- Russo, D. M.; A. Williams; A. Edwards; D. M. Posadas; C. Finnie; M. Dankert; J. A. Downie and A. Zorreguieta. 2006.** Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 188 (12): 4474-4486.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2.^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Scott, C. and S. C. Manning. 2003.** Basics of biofilm in

- clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J.* 82 (suppl.): 18-206.
- Sherwood, M. 1970.** Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J. Appl. Bacteriol.* 33 (4): 708-713.
- Siciliano, F.; P. Torres; L. Sendín; C. Bermejo; P. Filippone; G. Vellicce; J. Ramallo; A. Castagnaro; A. Vojnov and M. R. Marano. 2006.** Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathogenesis in *Citrus limon*. *Electron. J. Biotechnol.* 9 (3): 200-204.
- Southey-Pillig, C. J.; D. G. Davies and K. Sauer. 2005.** Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 187 (23): 8114-8126.
- Steinberger, R. E. and P. A. Holden. 2005.** Extracellular DNA in single and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9): 5404-5410.
- Stuurman, N.; C. Pacios Bras; H. R. Schlaman; A. H. Wijffjes; G. Bloemberg and H. P. Spaink. 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 (11): 1163-1169.
- Sutherland, I. 2001.** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147 (1): 3-9.
- Vojnov, A. A.; D. E. Bassi; M. J. Daniels and M. A. Dankert. 2002.** Biosynthesis of a substituted cellulose from a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* 337 (4): 315-326.
- Vojnov, A. A.; A. Zorreguieta; J. M. Dow; M. J. Daniels and M. A. Dankert. 1998.** Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* 144 (6): 1487-1493.
- Yun, M. H.; P. S. Torres; M. El Oirdi; L. A. Rigano; R. Gonzalez-Lamothe; M. R. Marano; A. P. Castagnaro; M. A. Dankert; K. Bouaraby and A. A. Vojnov. 2006.** Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol.* 141 (1): 178-187.