



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL COBRE DEL
AGENTE CAUSAL DEL CHANCRO DE LOS
CÍTRICOS**

***(Xanthomonas citri pv citri)* EN ISLA REUNIÓN**

TRABAJO Fin de Grado

Jose Antonio Bellón Clavel

2017



ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL COBRE DEL AGENTE
CAUSAL DEL CHANCRO DE LOS CÍTRICOS (*Xanthomonas citri pv
citri*) EN ISLA REUNIÓN

Jose Antonio Bellón Clavel

Director: Juan Antonio Martínez
Codirector: Olivier Pruvost

Proyecto Fin de Grado en Ingeniería de la Industria Agroalimentaria
Universidad Politécnica de Cartagena

Cartagena, 2017

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL COBRE DEL AGENTE
CAUSAL DEL CHANCRO DE LOS CÍTRICOS (*Xanthomonas citri*
pv citri) EN ISLA REUNIÓN**

**AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL PROYECTO FIN DE
CARRERA POR LOS DIRECTORES**

To whom in may concern

I, Dalila Bentaleb authorize Jose Bellón to present the work he has done from April to June 2015 at the Center of Agricultural Research for Development (CIRAD) in Reunion Island, in the frame of a study exchange between University of Cartagena and the Institute of Technology of Reunion University. This work based on the study of citrus bacterial disease: *Xanthomonas citri* has been summarized in a report and an oral presentation in French language.

Dalila Bentaleb



Cartagena 2017

Contenido

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. <i>Xanthomonas citri</i>	9
1.2. EL CHANCRO DE LOS CÍTRICOS	9
1.3. IDENTIFICACION Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD	12
Identificación en campo:.....	12
Tipos de chancro:.....	12
Control:	13
Utilización de cobre:.....	14
Erradicación:.....	14
1.4. Resistencia al cobre.....	15
2. OBJETIVOS:.....	17
3. MATERIAL Y METODOS	18
3.1. Recolección de muestras afectadas.....	18
3.2. Preparación de los medios de cultivo.....	18
3.3. Preparación de la solución de siembra.....	19
3.4. Extracción del ADN y PCR	19
Extracción de ADN mediante choque térmico:	19
Disolución para PCR (por tubo):	19
Programación de los termociclos.....	19
Migración sobre gel de agarosa:	19
3.5. Identificación de saprofitas por la técnica MALDI-TOF	20
Preparación de la matriz	20
Análisis de la placa:	20
Obtención de resultados.....	20
4. RESULTADOS	22

4.1. Crecimiento de bacterias saprofitas y XCC sobre diferentes medios...	22
4.2. PCR.....	22
XCC:	22
Saprofitas:	22
4.3. MALDI-TOF	23
Identificación	23
4.4. ANALISIS DE LOS DATOS	23
5. DISCUSIÓN	25
6. PERSPECTIVAS	26
7. BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	30

RESUMEN

Xanthomonas citri pv. *Citri* (*Xcc*) es uno de los principales problemas sanitarios para la producción mundial de cítricos, y una amenaza para los cultivos de la Unión Europea. Grandes cantidades de distintos tipos de cítricos se pierden cada año debido a los daños producidos por esta bacteria. La lucha química mediante compuestos a base de cobre es uno de los métodos incluidos en la lucha integrada contra la enfermedad, utilizados cuando la erradicación completa de la enfermedad ya no es posible. (Behlau *et al.*, 2007) Descrita por primera vez en América del sur en los años 1990, y en isla Reunión en 2015, la resistencia al cobre de *Xcc* supone un problema para combatir la enfermedad, debido, a que los principales compuestos utilizados, así como los que más efectivos resultaban, contenían cobre como elemento principal. En Argentina se llevó a cabo el análisis de una cepa de *Xcc* el cual puso de manifiesto, que esta resistencia se encontraba en el ADN y que provenía principalmente de tres genes, estos son los genes *cop LAB*, que se encuentran presentes en un plásmido de su ADN. (Behlau *et al.*, 2012 y 2013).

Una de las principales hipótesis planteadas, sobre como llegaron esos genes al ADN de *Xanthomonas* y motivo por el cual se ha realizado esta investigación es la que este plásmido haya cruzado por transferencia horizontal desde otra bacteria que también se encuentre presente en la microflora de cultivos afectados

ABSTRACT

Xanthomonas citri pv. *citri* (*Xcc*) is one of the principal sanitary problems for the citric world production, and also a menace for the European Union corps. A huge amount of different types of citrus are lost every single year due to the damage this bacteria causes. Chemical battle with copper derivate compounds is one of the options in the whole fight when the total eradication is already not possible. (Behlau *et al.*, 2007)

Described by first time in South America in the 90's decade, and in Reunion Island in 2015, copper resistance of *Xcc* is a problem when fighting this disease, because the main compounds used, and also the most effectives, were made a base of copper. One souche of *Xcc* have been analyzed in Argentina and it's been found that the copper resistance was located in de DNA and that it comes from 3 genes. These were named the genes *cop LAB*, which are found in a DNA plasmid of the bacteria (Behlau *et al.*, 2012 2013).

One of the main hypothesis, about how did these genes get into de *Xanthomonas* DNA and also the propose of this study is that this plasmid could have been gave by horizontal transference from another bacteria witch should also be present in the microflora of the affected corps.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Xanthomonas citri*

El aumento masivo de los viajes internacionales y el comercio han aumentado considerablemente el riesgo de introducción e invasión de organismos de un país o continente en otro (Gottwald *et al.*, 2002) Estas invasiones pueden afectar el comercio nacional e internacional. (Muraro *et al.*, 2000) En lo que concierne a los cítricos, *Xcc* representa una de las amenazas más significativas en zonas tropicales y subtropicales (incluyendo a La Reunión) (Gottwald *et al.*, 2002))

Xanthomonas pertenece a un género de proteobacterias de la familia Xanthomonadaceae, de la cual, gran cantidad de especies causan enfermedades en las plantas. Es un género de bacterias muy estudiado, que afecta a numerosas plantas de interés económico. Esta bacteria puede infectar gran cantidad de cultivos, como por ejemplo, el pimiento, arroz, limón, algodón, tomate, la mandioca y la soja (Graham *et al.*, 2004)

Xcc es una especie perteneciente a esta familia, responsable del chancro de los cítricos (Figura 1). Morfológicamente es una Gram -, con flagelo polar, y metabolismo aerobio estricto. Su siembra produce colonias amarillas y circulares, de aspecto mucoso cuando se cultiva sobre medios con glucosa. (Graham *et al.*, 2001))



Figura 1: Fruto y hojas de pomelo afectados por el chancro de los cítricos (Gottwald *et al.*, 2002)

1.2. EL CHANCRO DE LOS CÍTRICOS

El chancro de los cítricos, o chancro asiático de los cítricos, es una enfermedad bacteriana de origen asiático. Esta enfermedad afecta principalmente a las plantas de la familia de las Rutáceas y especialmente a los cítricos del género *Citrus* (Gottwald *et al.*, 2002)

Xcc produce síntomas sobre todos los órganos aéreos de la planta, y estos síntomas resultan morfológicamente apreciables en las hojas, tallos, espinas y frutos (Timmeret

al., 1996). Sobre las hojas aparecen manchas aceitosas circulares de uno a varios milímetros principalmente visibles en la cara inferior del limbo, que evolucionan en pequeñas pústulas ligeramente abombadas. (Gottwald *et al.*, 2002) Después las lesiones son visibles sobre ambas caras de las hojas, presentando color amarillo y dejando un cráter. También se observa un halo amarillo alrededor de las lesiones (Goto and Yaguchi 1979) El chancro bacteriano de los cítricos tiene a la vez, un fuerte impacto tanto sobre la calidad como sobre el rendimiento de los frutos. Los frutos se caen del árbol antes de su madurez óptima cuando la enfermedad está en una etapa avanzada. Si el fruto infectado se queda sobre el árbol, este podría conservar la calidad interior, pero perdería la calidad visual, la cual es esencial para la comercialización. (Graham *et al.*, 2004)

Xcc puede infectar los estomas de los cítricos cuando los órganos vegetales todavía están jóvenes pero cuando están maduros, se forma una cutícula protectora, la cual desarrolla resistencia a la infección estomatal (figuras 2 y 3)(McLean.*et al.*, 2000)

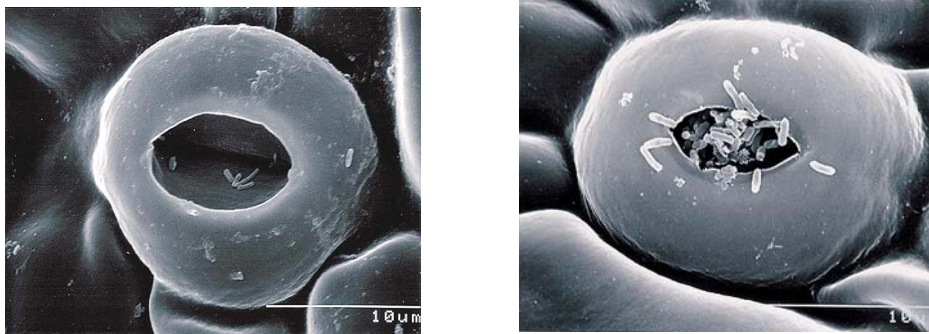


Figura 2: Estoma abierto infectado por bacterias y **Figura 3:** Bacterias entrando a través del estoma (Gottwald *et al.*, 2002)

De la misma manera cuando los tejidos todavía están muy jóvenes, los estomas todavía se encuentran inmaduros y cerrados, volviendo muy difícil la infección natural por los estomas. Los cítricos pueden infectarse sobre las lesiones que se producen a lo largo del desarrollo de la planta (McLean.*et al.*, 2000) . Estas heridas pueden estar provocadas por espinas (Figura 4), operaciones de mantenimiento de los árboles, el roce de las ramas en las épocas de viento, o insectos, como la mimosa asiática de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) (figura 5). (Gottwald *et al.*, 2002))



Figura 4 Hojas con heridas infectadas por *Xcc* y **Figura 5** Surcos dejados por la mimosa asiática con y sin infección (Gottwald *et al.*, 2002)

La dispersión natural de *Xcc* se efectúa a través de la lluvia y mediante transporte por el viento (figura 6). Vientos de ráfagas superiores a 8 m/s permiten la diseminación de árbol en árbol en los cultivos. Vientos superiores favorecen la penetración de la bacteria y aumentan las distancias de diseminación. Las distancias máximas de diseminación natural, abarcan varias decenas de kilómetros en el caso de ciclones particularmente intensos. La diseminación a grandes distancias, procede, principalmente de causas humanas. (Graham *et al.*, 2004)

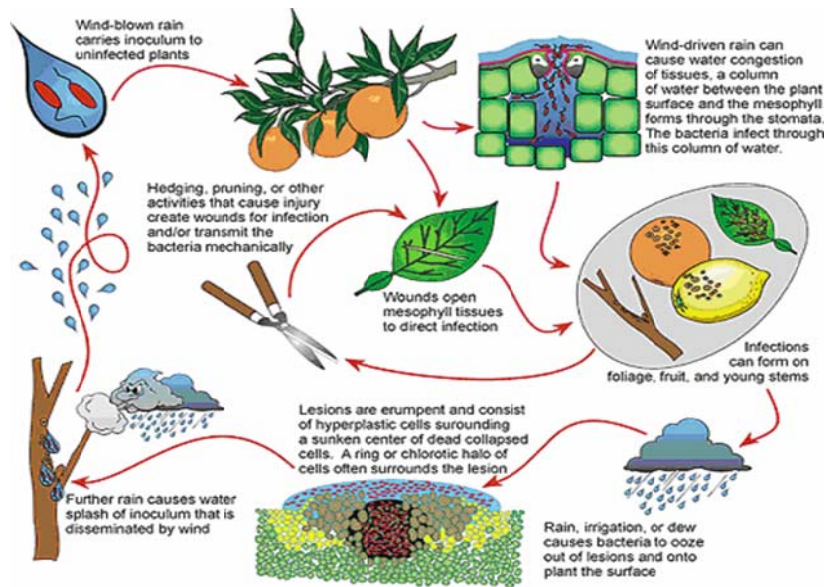


Figura 6: Ciclo de propagación de la enfermedad (Gottwald *et al.*, 2002)

1.3. IDENTIFICACION Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Identificación en campo:

A pesar de que los síntomas dejados por la bacteria en hojas, tallos y frutos resultan una identificación fiable de la presencia de la enfermedad en el cultivo, una detección tardía supone que la erradicación se va a ver prácticamente imposibilitada, debido a lo cual, solo se podrá intentar, llegados a este punto, reducir su incidencia lo máximo posible. Los planes de muestreo estadístico son utilizados para la inspección de cultivos en aquellos países donde los métodos de erradicación son llevados a cabo, y en los cuales la cuarentena ha sido impuesta. (Graham *et al.*, 2004). Es recomendable inspeccionar los límites de la plantación, sobre todo las zonas sobre las cuales incide el viento. La inspección constante ayuda a la detención precoz de la enfermedad. Todo el material vegetal sospechoso debe ser enviado a laboratorio. Cuando se detecta una primera infección se debe comenzar inmediatamente a la eliminación de los árboles próximos, en un radio de seguridad, que puede llegar a entre 550 y 600 m cuando el árbol se encuentra gravemente afectado. Los árboles deben ser incinerados y las zonas erradicadas, deben limpiarse. La zona debe ponerse inmediatamente en cuarentena, debido a que es posible que la bacteria continúe presente en el cultivo. (Gottwald *et al.*, 2002)

Tipos de chancro:

Se observan distintos tipos de Chancros causados por diversos patovares y variantes de la bacteria. Los síntomas suelen ser similares, debido a lo cual, las diferencias entre unos tipos y otros se basan en el rango de hospedadores, características fisiológicas y culturales, homólogos del ADN sensibilidad a bacteriófagos y otros análisis. (Hartung, 1992.). Estos tipos son los siguientes:

Chancro A (asiático): Es la forma del chancro de los cítricos más extendida y destructiva, es causada por *Xcc*. Las cepas que causan el Chancro de tipo A, son patógenas de la mayoría de cítricos que se cultivan



Figura 7: Limones infectados con el chancro de tipo B (Gottwald *et al.*, 2002)

Chancros A* y A^w: Estas cepas se encuentran principalmente en Asia. Estas cepas afectan únicamente a la lima mejicana (*Citrus aurantifolia*) y especies cercanas, su incidencia global está, por lo tanto, limitada. Aun así, las limas mejicanas infectadas con la cepa A* pueden presentar síntomas muy severos.

Chancro B: Causado por *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, este tipo es típico en América del sur. Su rango de infección es más amplio que los chancros A* y A^w, afectando también a naranjos y pomelos. Su incidencia es muy débil, y han llegado a estar una veintena de años sin aparecer en los cultivos. Las cepas de Chancro B pueden ser fácilmente diferenciadas del chancro A (Figura 7)

Chancro C: Causado también por *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, pero más limitado a la lima mejicana o brasileña. Tiene poca repercusión económica. (Gottwald *et al.*, 2002.)

Control:

En los países los cuales están libres del chancro de los cítricos o bien este ha sido erradicado, se establecen medidas de cuarentena de modo que se prevenga la introducción y asentamiento de *Xanthomonas citri* pv. *citri*. (Graham *et al.*, 2004)

Se han utilizado numerosos métodos para intentar luchar contra esta enfermedad, pero resulta difícil controlarla cuando ya ha comenzado a propagarse (Behlauet *al.*, 2007). Para realizar un control lo más eficaz posible, en caso de que la enfermedad todavía no se encuentre presente en el país, la primera medida, será siempre la prevención. Para prevenir la entrada de la bacteria hace falta establecer las medidas de cuarentena necesarias que prevengan de la entrada de cítricos provenientes de países extranjeros infectados. La aplicación de restricciones sobre la importación de frutas provenientes de zonas infectadas se encuentra regulada por la Unión Europea (Graham *et al.*, 2004)

En la región donde *Xcc* es endémica, la erradicación resulta imposible y la lucha reposa sobre una estrategia integrada de: plantación de cítricos sanos, riego por goteo, mallas, corta vientos, variedades poco sensibles (mandarina y algunas variedades de naranja), eliminación física de los inóculos y buena aireación de los árboles por las operaciones de poda y tratamientos a base de cobre (o de antibióticos, en ciertos países) (Figura 8) (Behlauet *al.*, 2007)

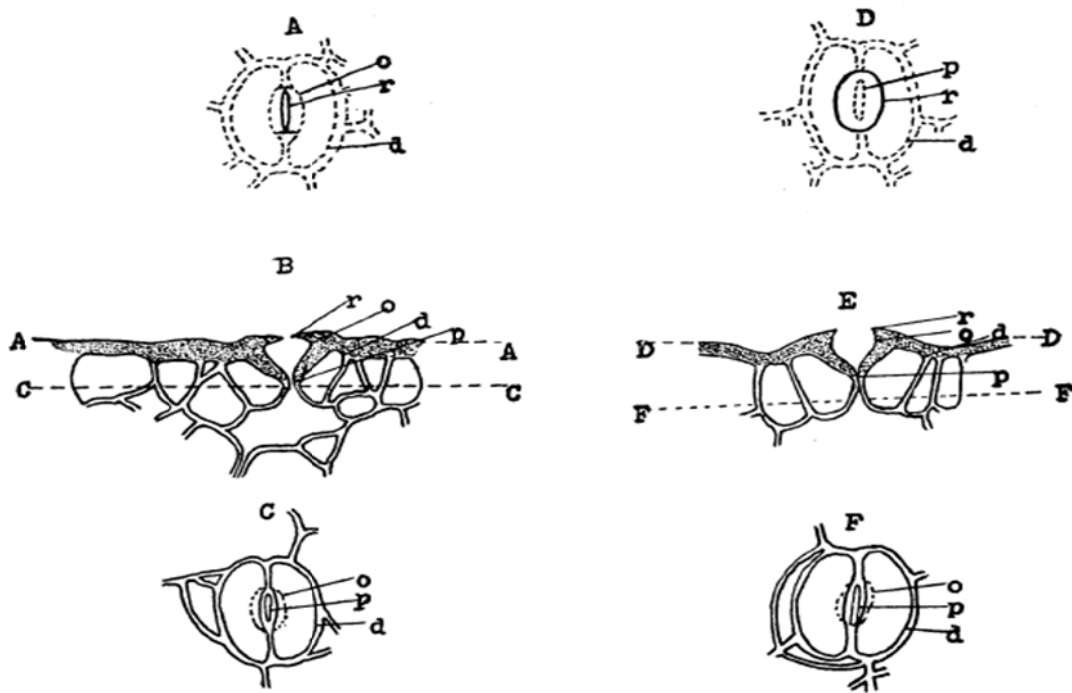


Figura 8: Estomas de mandarina y pomelo, se observa que el estoma del pomelo, a la derecha, es más grande, lo que lo hace más susceptible a la infección (Behlauer *et al.*, 2007)

Utilización de cobre:

Los tratamientos a base de cobre se utilizan con mucha frecuencia dentro del cuadro de la lucha integrada recomendada, usándose como medida principal e incluso única en algunos casos. (Behlauer *et al.*, 2010) El cobre tiene una acción preventiva y actúa por contacto, reduciendo las poblaciones bacterianas presentes en la superficie de las plantas. La eficacia de los tratamientos a base de cobre requiere aplicaciones repetidas cuando las plantas presentan órganos sensibles. El cobre no afecta a la población de *Xcc* la cual se encuentra presente en los síntomas. (Behlauer *et al.*, 2007) Se han buscado muchos compuestos con actividad bactericida, y los más eficaces se ha observado que son: el oxiclورو, el sulfato, el carbonato de amonio, y el hidróxido y óxido de cobre (Graham *et al.*, 2004)

Erradicación:

La erradicación es teóricamente posible debido a que *Xcc* es incapaz de sobrevivir largos periodos de tiempo al exterior de su hospedador, posee una fuerte especialización parasitaria, y que no posee un vector específico (aparte del hombre (Burningsy Gabriel 2003). Existen algunos casos donde la erradicación ha sido un éxito, como EEUU a principios del siglo XX, África del Sur, Australia o Nueva Zelanda, son algunos ejemplos. (Cubero *et al.*, 2001). En Brasil, por ejemplo, el proceso de

erradicación ha consistido, durante numerosos años en eliminar las plantas enfermas y todas las plantas situadas en un radio entre 30 y 50 m. Esta estrategia ha permitido mantener la enfermedad a unos niveles muy bajos, pero no ha conseguido eliminarla completamente. (Graham *et al.*, 2004)

Al final de los años 90, la introducción del minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) aumentó la incidencia del Chancro A en Brasil. Después de esto, se decidió que la mejor opción era la eliminación de todos los árboles en parcelas que presentasen más de un 0.5% de incidencia de la enfermedad (Behlau *et al.*, 2007). En Florida la erradicación llevada a cabo desde 1986 ha consistido en arrancar los árboles enfermos y todos los situados en un radio de 32m. En 1995 debido a una epidemia causada por un intenso ciclón, se decidió eliminar todos los árboles en una radio de 579m desde el punto de detección. Sin embargo, debido a la oposición de los propietarios, esta medida nunca pudo llevarse a cabo y la epidemia se propagó por el efecto de los huracanes. Actualmente, la enfermedad está ampliamente extendida por esta zona, y la erradicación se ha abandonado (Gottwald *et al.*, 2002)

1.4. Resistencia al cobre

Además de la eficacia parcial para controlar las poblaciones de *Xcc*, los bactericidas a base de cobre presentan algunas desventajas a largo plazo: como la obtención de resistencia al cobre de la bacteria y acumulación de cobre en el suelo, dando problemas fitotóxicos. Cuando el

cobre se encuentra en el suelo, este se une fuertemente a los materiales orgánicos y a los minerales. Sobre suelos ricos en cobre, este se puede acumular sobre las plantas y solo un número limitado de plantas tiene posibilidad de sobrevivir. (Behlau, *et al.*, 2012) Para minimizar las pérdidas de recolección, es necesario realizar

varias aplicaciones de cobre cada año (Schek. *et al.*, 1998). En el caso de las *Xanthomonas*, la resistencia al cobre suele ir ligada a unos genes llamados genes *cop*, pero su soporte genético puede variar. Estos genes se encuentran principalmente en plásmidos, pero pueden también encontrarse en los cromosomas. (Behlau *et al.*, 2013) En el caso de la

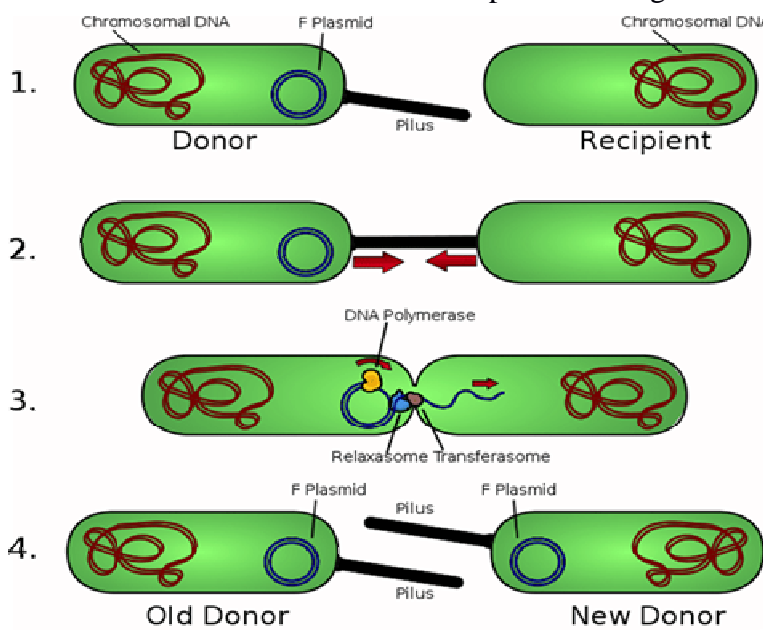


Figura 9: Proceso de intercambio genético (conjugación) entre dos células (Wikipedia)

varias aplicaciones de cobre cada año (Schek. *et al.*, 1998). En el caso de las *Xanthomonas*, la resistencia al cobre suele ir ligada a unos genes llamados genes *cop*, pero su soporte genético puede variar. Estos genes se encuentran principalmente en plásmidos, pero pueden también encontrarse en los cromosomas. (Behlau *et al.*, 2013) En el caso de la

resistencia por plásmidos, los genes de resistencia al cobre podrían ser resultado de transferencia horizontal de genes por numerosos mecanismos como la conjugación (figura 9) o la transformación (Behlau *et al.*, 2012)

Las cepas de Xcc resistentes al cobre (Cu^{R}) fueron aislados por primera vez en 1994 en Argentina en los campos que presentaban una débil eficacia a los numerosos tratamientos de cobre utilizados. Una cepa de Xcc originaria de Argentina portaba los genes *cop* en un plásmidoconjuntivo de 300kb. (Gottwald *et al.*, 2002) Una descripción de los genes *cop* presentes en *Xanthomonas* reveló que la resistencia al cobre se encontraba ligada principalmente a los genes *copL*, *copA* y *copB*, los cuales se encuentran presentes en las cepas Cu^{R} de Xcc, *X. alfalfaesubsp. citrumelonis*, *X. arboricola pv. juglandis*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, y *Xanthomonas sp*(Behlau *et al.*, 2013)La función de los genes *Cop* no se conoce bien, pero es probable que de dos de ellos actúen a modo de queladores, mientras que, el tercero, tendría funciones reguladoras.(Cooskey 1996) Aunque no se han llevado a cabo muchos estudios, estos genes parecen encontrarse en un plásmido. La filogenia de estos genes muestra la presencia de alelos idénticos en especies alejadas, sugiriendo, que losplásmidos pueden haberse obtenido por transferencia horizontal. (Figura 10)(Basim. *et al.*, 2005)

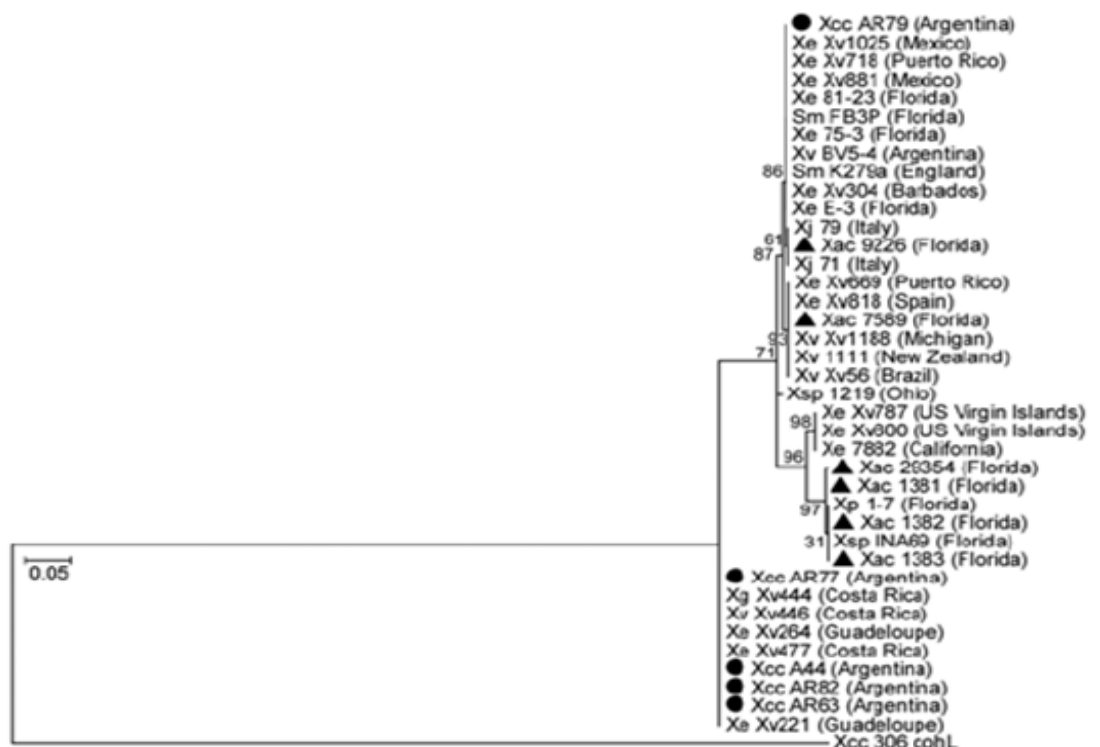


Figura 10: Árbol filogenético de los genes *cop* en distintas especies de *Xanthomonas* y *Streptophomonas* (Behlau *et al.*, 2012)

Un gran número de bacterias saprofitas Cu^R se encontraron en EEUU en cultivos de cítricos intensamente tratados con cobre (Behlau *et al.*, 2012). Por contra, solo una bacteria taxonómicamente próxima a *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, posee en su genoma los genes *cop*, homólogos de los presentes *Xcc*. (Behlau *et al.*, 2013)

Para la identificación de las cepas Cu^R se realiza principalmente una amplificación de los genes por PCR a partir de tres pares de cebadores, los cuales presentan los tres genes *cop* principales. Los cebadores *copA* (870pb), *copB* (531pb) e *copL* (356pb) se utilizan para la identificación de cepas Cu^R y Cu^S sobre distintos tipos de bacterias. En el caso de las bacterias Cu^S no se produce amplificación del ADN. La organización básica de los genes *cop* se describe en la figura 11 (Behlau *et al.*, 2013)

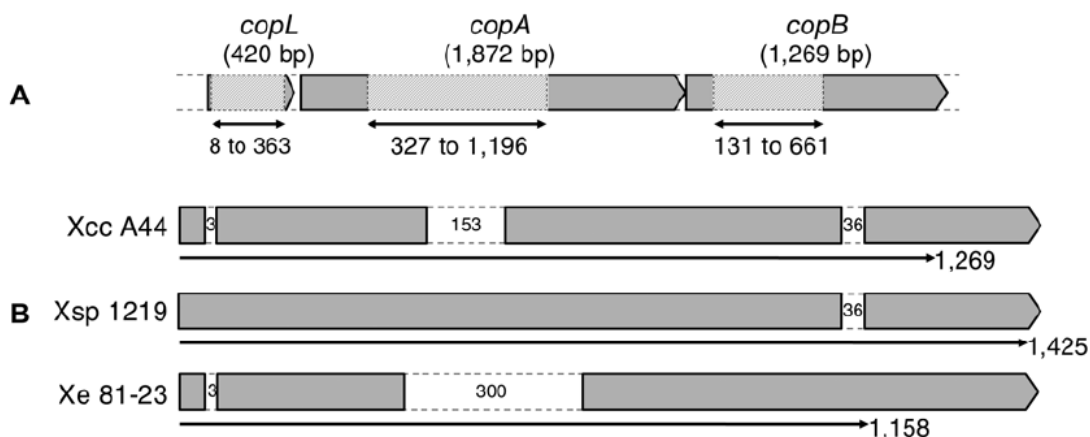


Figura 11: A: Posición y tamaño de los genes *cop* en *Xcc* cepa A44

B: Diferencias entre el gen *copB* de tres especies distintas de *Xanthomonas* (Behlau *et al.*, 2013)

2. OBJETIVOS:

Este proyecto perseguía 3 objetivos principales:

-Poner en evidencia la resistencia al cobre mediante PCR, y determinar su prevalencia. Para todas las colonias saprofitas resistentes al cobre hizo falta buscar la presencia de los genes *cop* y determinar la frecuencia de bacterias resistentes que presenten los genes.

-Estimación de la población bacteriana saprofita resistente al cobre y su identificación por la técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-- Time-Of-Flight*).

-Buscar los genes implicados en la resistencia al cobre de *Xcc* sobre la microflora bacteriana de los cítricos. También hizo falta aislar las diferentes colonias de *Xcc* y encontrar si presentan o no genes *cop* y con qué frecuencia

3. MATERIAL Y METODOS

3.1.Recolección de muestras afectadas

Se tomaron como muestras para analizar varias hojas de cítricos de dos cultivos donde se sabía que la enfermedad estaba presente.

-La primera muestra se tomó de un cultivo de combava (*Citrus hystrix*)

- La segunda se tomó de un cultivo de tangor, un híbrido entre *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*.

De cada cultivo, se tomaron 5 lotes de 25 hojas sin síntomas cada uno, también se tomaron 80 hojas las cuales presentaban los síntomas del chancro de los cítricos

3.2.Preparación de los medios de cultivo

Se prepararon medios específicos para distintos objetivos, por un lado se deseaba aislar las bacterias saprofitas resistentes al cobre que se encontrasen sobre las hojas sanas y, por el otro lado, las colonias de *Xcc* que se encontrasen en hojas contaminadas.

El medio de cultivo utilizado para aislar *Xcc* fue un agar LPGA que estaba compuesto de: levadura (7g/l), pastone (7g/l), glucosa (7g/l), agar (18g/l) y NaOH 1N (3,3ml/l). Además se le añadieron dos antibióticos: Kasugamycin(20mg/l) y Cephalaxine(40mg/l) con el fin de obtener un medio semiselectivo que permitiera aislar *Xcc*

Para las bacterias saprofitas, se realizaron varios medios de cultivo de LPGA, con distintas concentraciones de cobre. Se aplicaron dosis de 150, 200,250 y 300 ppm de cobre con el objetivo de conocer que medio era el más adecuado para el crecimiento de bacterias resistentes al cobre (Cu^{R}). Después se seleccionaron las concentraciones de 200, 250, y 300 de los cultivos combava y solo el medio con 300ppm para el de tangor.

Para las bacterias saprofitas se utilizó también un medio de cultivo CYE+cobre (0.1% de pastone, 0,0035% de extracto de levadura, 2ml/l de glicerol y 15g/l de agar y 64mg/l de CuSO₄).

3.3.Preparación de la solución de siembra

Xcc: Trituración de 1cm² de hojas con síntomas sobre 1ml de tampón TRIS (trishidroximetilaminometano) a pH 7,2y después siembra sobre el medio e incubación durante 72h a 28°C

Saprofitas: Cada grupo de hojas sin síntomas se trituró y se mezcló con 500ml de TRIS (20ml por hoja). Después se sembraron la solución pura, una dilución en 10 partes, y una solución 10 veces concentrada.

3.4.Extracción del ADN y PCR

Extracción de ADN mediante choque térmico:

Un asa de siembra coge 1µl de bacterias y se disuelve en 1ml de tampón TRIS; se calienta la disolución a 100°C durante 2 minutos, y se enfría en cubitera de hielo durante 5 minutos.

Disolución para PCR (por tubo):

14,9 µl de agua; 5 µl de Tampón 5x; 1,5 µl de MgCl₂ 25mM; 0,4 µl de dNTP (10mM); 0,5 µl de cebadores U y L (25µM); 0,2 µl de Taq (5U/µl) y 2 µl de la extracción de ADN realizada por choque térmico.

Programación de los termociclos

5min a 95°C para desnaturalización inicial, después se realizaron 30 ciclos PCR en las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95°C durante 30s, hibridación a 70°C durante 30s para el cebador *copL*, y 60°C para los cebadores *copA* y *copB*, y elongación a 72°C durante 45sec. Por último, la elongación final fue 10min a 72°C y estabilización de la temperatura a 12 °C.

Migración sobre gel de agarosa:

Se preparó un gel de migración al 1% (1g de agarosa sobre 100ml de Tampón TAE (Tris Acetato Etileno Di amino Tetra-Acético)). Se depositaron 5µl de producto PCR incluyendo el azul de carga sobre cada hueco y migrar durante 1hora a 100 voltios.

Se revelo el gel migrado con BrEt (Bromuro de Etidio) durante 5 minutos y después de enjuagó con agua y se observaron las bandas resultantes mediante exposición a UV

3.5. Identificación de saprofitas por la técnica MALDI-TOF

Las bacterias saprofitas se identificaron mediante la técnica MALDI-TOF que consiste en una ionización suave de la muestra que provoca la vaporización de intactas moléculas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un rango de peso molecular entre 2 a 20 kDa, a un relativo bajo costo y resultado inmediato.(11)

Preparación de la matriz

-El aparato MALDI-TOF identifica las bacterias sobre una placa metálica específica en la cual se encuentran 96 posiciones para mezclar la muestra que se quiera identificar. Para su identificación hay que sembrar alrededor de 0,1µl de solución bacteriana.

- Añadir 1,1 µl de ácido orgánico sobre cada siembra

Análisis de la placa:

Para la identificación bacteriana, el MALDI-TOF se sirve del software “IviMaldiBiotiper” el cual se encarga de medir el tiempo, la distancia de vuelo y el tamaño de las proteínas (picos) liberadas por las bacterias que han sido ionizadas

Obtención de resultados

Estos picos obtenidos se comparan con los de una bacteria usada como referencia, la cual era *E.coli*. La comparación de los picos obtenidos con los picos de *E.coli*, permite al programa reconocer la bacteria sembrada en la placa, gracias a una base de datos y con una fiabilidad mayor o menor la cual se refleja en el valor obtenido. (Tabla 1)

Vaor	Descripción	Color
2.300...3.000	Identificación de género y especies seguras	Verde
2.000...2.299	Identificación de género segura y especie probable	Verde
1.700...1.999	Identificación de género probable	Amarillo
0.000...1.699	Insuficiente seguridad en la identificación	Rojo

Tabla 1: Posibles grados de identificación proporcionados por el MALDI TOF

Campo 1					
Bacterias/hoja	1	2	3	4	5
Cu III	1,E+04	2,E+04	4,E+05	2,E+04	1,E+05
CYE	1,E+03	2,E+04	6,E+04	4,E+03	6,E+04

Campo 2					
Bacterias/Hoja	1	2	3	4	5
Cu III	3,E+04	4,E+05	2,E+05	5,E+04	6,E+04
CYE	2,E+05	1,E+06	6,E+05	2,E+05	6,E+05

Tabla 2: Recuento de bacterias crecidas en medio LPGA y CYE

4. RESULTADOS

4.1. Crecimiento de bacterias saprofitas y XCC sobre diferentes medios

XCC: De las 49 siembras realizadas sobre medio LPGA-KC, se seleccionaron 43 cepas del primer cultivo y 49 cepas de *Xcc* del segundo.

Saprofitas: La cantidad de bacterias saprofitas obtenidas en los medios de cultivo de CYE y LPGA+300ppm de cobre están detalladas en la tabla 2

La morfología de 38 colonias diferentes del primer campo cultivadas sobre los medios selectivos a base de cobre y 40 del segundo se encuentran descritas en el segundo anexo

4.2. PCR

XCC:

Campo 1, Combava: Del primer campo, se analizaron 43 cepas, de las cuales, 24 presentaban el gen *copL* (55%)

Campo 2, Tangor: En el segundo campo, se analizaron 49 cepas y se obtuvo que 43 de ellas presentaban el gen *copL* (88%)

Saprofitas:

Campo 1: El total de las bacterias saprofitas del primer campo dieron resultados negativos en la amplificación por PCR de modo que hubo un 0% de presencia de genes *cop*

Campo 2: En el segundo campo, de las 80 bacterias estudiadas, se encontró una bacteria (la bacteria 3.1) la cual dio positivo en la amplificación de genes *copL* y también en los genes *copAB* realizados como verificación

4.3.MALDI-TOF

Identificación

La técnica MALDI-TOF se aplicó dos veces de forma independiente con las bacterias del primer campo (combava). En el caso de bacterias donde la identificación ha sido inferior a 1.7 donde ni siquiera hay fiabilidad respecto al género, los resultados no se han tenido en cuenta. Los resultados han revelado que depositar cantidades demasiado grandes de paté bacteriano sobre la placa de MALDI-TOF podría entorpecer la identificación. Para confirmar esta hipótesis se han utilizado dos cepas testigo. La bacteria 37-1 del primer campo y la 3-1 del segundo se han analizado por triplicado con 3 cantidades distintas de siembra (pequeña, mediana y elevada). Esta comprobación demostró que cantidades demasiado grandes o demasiado pequeñas podían dar problemas a la hora de identificar de que bacteria se trataba. Los testigos de *Xcc* utilizados han sido identificados correctamente a nivel de género en todos los casos, a veces como especie *X.Citri* y otras como *X.axonopodis*

Campo 1 (Combava): En total de las 93 bacterias analizadas (92 colonias saprofitas + *E.coli*), se han obtenido 11 identificaciones fiables a nivel de especie, todas ellas entre unos valores de probabilidad entre 1,7 y 2 (Anexo 1- tabla 2). Aparte, algunas bacterias han sido correctamente identificadas a nivel de género. Además, el filo de todas las identificaciones con un coeficiente mayor de 1.3 se han buscado en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)

En total, de 107 identificaciones diferentes, 25 bacterias eran del tipo Gram + (25%) de las cuales 6 eran actinobacterias y 19 endobacterias. Las 80 bacterias restantes eran Gram – (75%) de las cuales 65 pertenecían al grupo de las gammaproteobacterias, 12 eran alphaproteobacterias, 2 betaproteobacterias y 1 epsilonproteobacteria.

Campo 2 (Tangor): De las 72 bacterias saprofitas analizadas se obtuvieron 45 identificaciones (62%) (Anexo 1). De estas 45, 12 fueron Gram + (25%), 8 fueron actinobacterias y 4 endobacterias. Las 33 restantes eran Gram – (75%) de las cuales 31 eran gammaproteobacterias, y 6 alphaproteobacterias. Por contra, la maquina no identifico correctamente la bacteria que poseía los genes *cop (3.1)*, quedando la identificación por debajo de 1.7, sin embargo, la identificación siempre coincidió en que esta bacteria pertenecía al género *Stenotrophomonas*.

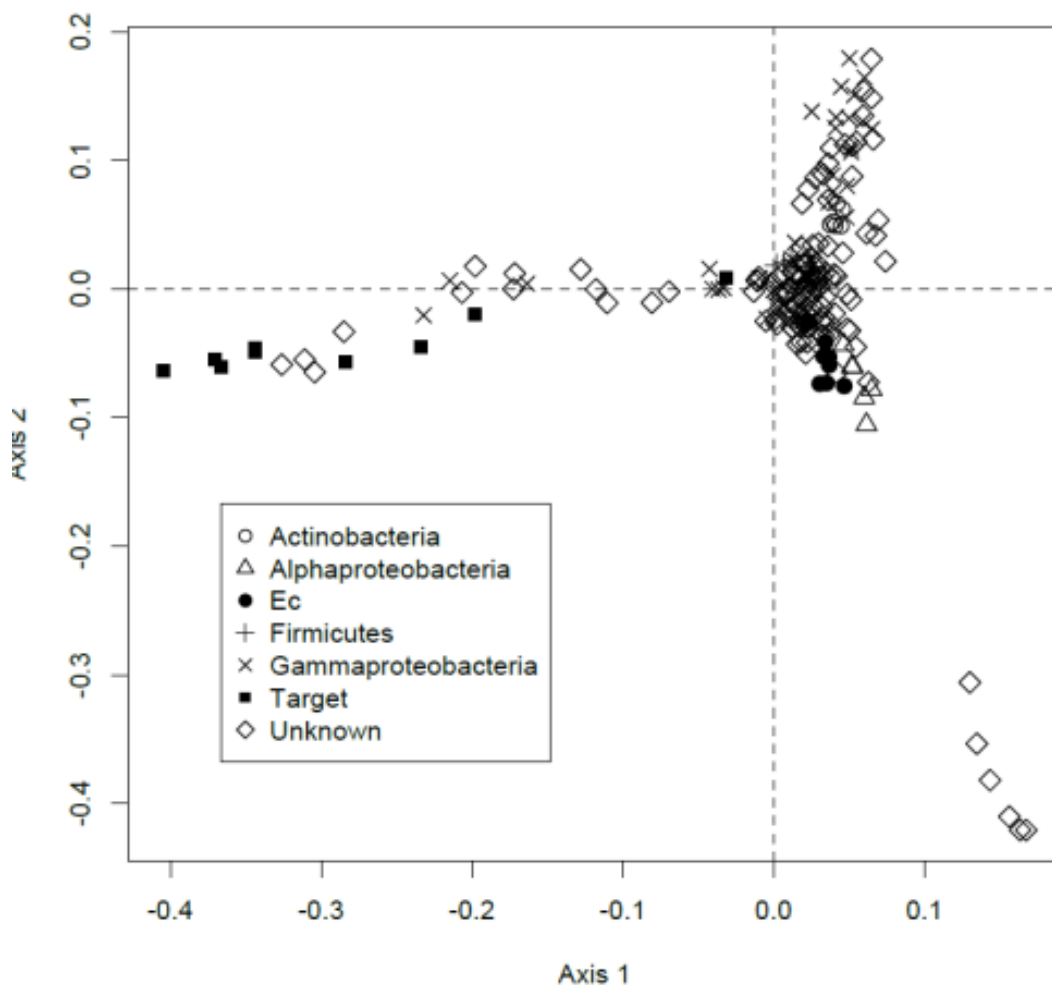
4.4.ANALISIS DE LOS DATOS

Para obtener una referencia sobre los datos que se habían obtenido con el equipo MALDI-TOF, se compararon las bacterias obtenidas en ambos cultivos. Los picos

obtenidos de todas la bacterias de ambos cultivos se agruparon en intervalos de 30Dalton (Da) y se obtuvo una tabla con 499 variables. Después se realizó una matriz binaria con las opciones presencia o ausencia de picos. Entonces se utilizó el índice de similitud de Jaccard para obtener la similitud entre ambos grupos de bacterias. Este índice asignaba valores intermedios entre 0(ninguna similitud) y 1 (similitud total) . Se realizó una representación gráfica de los resultados usando el programa « multidimensional scaling ». (Figura 10)

Los gráficos se realizaron con todas las bacterias saprofitas de los campos 1 y 2, incluyendo aquellas las cuales obtuvieron un índice de identificación inferior a 1,7 con la técnica MALDI-TOF, las cuales se han recogido en el grupo «unknown» así como las cepas de *E.coli* usadas para la calibración del aparato.

Los gráficos muestran que la gran mayoría de bacterias se encuentran agrupadas en una nube de puntos central, siendo, las que se encuentran más alejadas, principalmente bacterias mal identificadas. Esto nos dice, que las bacterias saprofitas presentes en los cultivos de cítricos, no se encuentran fisiológicamente muy alejadas unas de otras, y muestran evidentes índices de similitud.



5. DISCUSIÓN

El hecho de que los genes *cop* se encuentren frecuentemente portados por plásmidos y también que alelos idénticos se hallan detectado sobre cepas filogenéticamente distantes sugiere la posibilidad de que los alelos idénticos hayan sido seleccionados en respuesta a una misma presión de selección sobre especies hospedadoras distintas o que los fenómenos de conjugación bacteriana hubiesen sido el origen de transferencias horizontales

Xanthomonas es un género de bacterias cuyos patovares presentan una fuerte especialización parasitaria, por ejemplo *Xcc* únicamente infecta a los cítricos, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* es patógena del arroz y *Xanthomonas vesicatoria* afecta solamente a los tomates

Estas diferentes especies de *Xanthomonas* nunca compartirían el mismo nicho ecológico. Esto sugiere que los plásmidos los cuales son el origen de su resistencia podrían provenir de bacterias que residiesen en la filosfera de las plantas. Esta filosfera se encuentra mayoritariamente compuesta de especies saprofitas.

Por eso mismo, este estudio se ha iniciado para determinar si, en los campos donde se cultivan cítricos, donde la presencia de cepas de *Xcc* Cu^R esta cerciorada, se encuentran otras bacterias, distintas de *Xcc*, pertenecientes a la filosfera las cuales sean resistentes al cobre y presenten los genes *cop*.

La prevalencia de la enfermedad es probablemente debido a las prácticas agrícolas las cuales realizan un uso reiterado de los compuestos a base de cobre. En el cultivo de tangor, la fuerte prevalencia de la enfermedad (88% en 2015 y 100% en 2014) podría tener una estrecha relación con los numerosos tratamientos aplicados por el agricultor. Igualmente los altos índices de la enfermedad se vieron favorecidos por el hecho de que es un cultivo medianamente sensible a la enfermedad sumado a las frecuentes lluvias, las cuales facilitan su propagación, en la zona en la cual este cultivo se encontraba. Por el contrario, en el cultivo de combava la prevalencia fue más baja (55%), posiblemente en relación con el hecho de que el agricultor abandonó la parcela debido a los elevados daños producidos por la enfermedad. El combava es muy sensible a la enfermedad y esta tuvo una prevalencia elevada mientras estaba siendo tratada (70 y 88% en 2010 y 2012 respectivamente). Si esto es cierto, implicaría que la capacidad de adaptación de las cepas de *Xcc* Cu^S Es superior a aquellas que son Cu^R, dato que deberá ser verificado experimentalmente.

Para las bacterias saprofitas, se contaron una gran cantidad de bacterias en medios de cultivo con cobre, pero, finalmente, solo 1 de ellas se identificó positivamente como portadora de los genes *cop* mediante la amplificación por PCR. El MALDI-TOF, no consiguió identificar correctamente la especie, pero sí que nos dió con elevada fiabilidad (debido a varias réplicas) que *Stenotrophomonas* era el género de

esta bacteria. Estos resultados confirman el trabajo que Behlau llevo a cabo en USA. Según este estudio, la gran mayoría de cepas resistentes al cobre no poseían los genes *cop* a excepción de una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* y otra cepa no patógena de *Xanthomonas*.

CONCLUSIONES

En la microflora de los dos tipos de cultivos seleccionados se han encontrado una gran cantidad de bacterias las cuales han sido capaces de crecer en medios de cultivo enriquecidos con cobre (anexo 2). Sin embargo, de todas ellas, solo una (*Stenotrophomonas maltophilia*, presente en el cultivo de Tangor) dio positivo en la amplificación por PCR de los genes *cop*, esto quiere decir que la teoría de “” podría ser cierta para este caso, sin embargo, en principio, y a la espera de realizar nuevos estudios, la microflora saprofita del cultivo de combava no ha mostrado la presencia de estos genes, a pesar de que la enfermedad se encontraba presente y se identificó como resistente al tratamiento. De todos modos, estos genes podrían estar presentes en otras bacterias presentes en el cultivo las cuales no hayan conseguido proliferar en el medio de cultivo preparado debido a una cantidad de estas insuficiente.

Por otro lado, la técnica MALDI-TOF ha permitido de forma rápida, fácil y con bajo coste identificar algunas de las bacterias que habitan en la filosfera de los cítricos. Es posible, que la dificultad encontrada para la identificación de algunas de las bacterias se deba a que la identificación estaba basada en una base de datos, la cual, debido a que este aparato pertenecía al hospital, estaba más especializada en bacterias patógenas con interés clínico., y tenía menos datos sobre bacteria ambientales. De todos modos, las ligeras variaciones del espectro de picos obtenidos para distintas réplicas de una misma cepa, ponen en dicho la importancia de realizar varias réplicas y de cultivar las cantidades justas de pate bacteriano.

6. PERSPECTIVAS

Todavía quedan numerosos puntos que se deben continuar desarrollándose después de esta investigación. Más cultivos deben ser estudiados con el fin de seguir encontrando más bacterias saprofitas que sean portadoras de los genes *cop*. De igual manera se deberán analizar parcelas con cultivos que no hayan recibido tratamientos cúpricos a fin de estimar la densidad y los grupos taxonómicos de población resistente en este contexto.

La bacteria saprofita encontrada portadora de los genes *cop* deberá ser identificada de forma fiable. Esto se podría realizar secuenciando el ARN ribosómico.

La secuencia de ADN completa permitirá determinar el soporte genético y el ambiente en el cual se encuentra presente la cepa de esta bacteria portadora de los genes *cop*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Basim, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Wang, J. F., Shanker, S., and Jones, J. B. 2005. Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria*.

Behlau F., Amorim L., Belasque J., Bergamin Filho A., Leite R. P., Graham J. H. and Gottwald T. R. 2010 Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays.

Behlau, F., Canteros, B. I., Jones, J. B., and Graham, H. J. 2012. Copper resistance genes from different *Xanthomonas* and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Molecular Plant Pathology

Cubero, J., Graham, J.H. and Gottwald, T.R. (2001) Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker.

Behlau F., Belasque J., Bergamin Filho A., Graham J.H., Leite Jr, Gottwald T.R. 2007. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil.

Behlau F., Hong J. C., Jones J. B., and Graham J.H. 2013, Evidence for Acquisition of Copper Resistance Genes from Different Sources in Citrus-Associated *Xanthomonas*

Behlau F., Jeffrey B. Jones, Monty E. Myers, James H. Graham. 2010 Monitoring for resistant populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated with copper or streptomycin using a new semi-selective medium

Donald A. Cooskey. (1996) Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria

Graham J. H., Gottwald T. R., Cubero J. and Achor D. S. 2004 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker.

Gottwald, T. R., Graham, J. H., and Schubert, T. S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact.

Goto, M., and Yaguchi, Y. 1979. Relationship between defoliation and disease severity in citrus canker (*Xanthomonas citri*).

Hartung, J. S. 1992. Plasmid-based hybridisation probes for detection and identification of *Xanthomonas citri* pv. *citri*. Plant Dis.

Jalan N., Yan Q., Kogenaru S, Graham J. H. , and Wang N.. 2014 Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species

McLean F. T., A Study of the Structure of the Stomata of Two Species of Citrus in Relation to Citrus Canker

Muraro, R. P., Roka, F., and Spreen, T. H. 2000. An overview of Argentina's citruscanker control program with applicable costs for a similar program in Florida

Scheck, H. J., and Pscheidt, J. W. 1998. Effect of copper bactericides on copper-resistant and -sensitive strains of *Pseudomonas syringaepv. syringae*.

Timmer, L. W., Zitko, S. E., and Gottwald, T. R. 1996. Population dynamics of *Xanthomonascampestrispv. citri* on symptomatic and asymptomatic citrus leaves under various environmental conditions.

Wikipedia

ANEXOS

ANEXO 1: Resultados obtenidos con el MALDI-TOF

Campo de Tangor

Numero de muestra en la siembra	de	Número de identificación de la muestra	Nombre del organismo	Fiabilidad
A1		E coli	Escherichiacoli	2,206
A3		2	Enterobacterkobei	1,783
A6		5	Pseudomonas oryzihabitans	1,776
A7		6	Escherichiavulneris	1,907
A8		7	Citrobacterbraakii	1,731
B4		15	Pseudomonas oryzihabitans	1,937
D4		39	Enterobacterkobei	1,86
D5		40	Enterobacterasburiae	1,838
D6		41	Pseudomonas oryzihabitans	1,74
D9		44	Pseudomonas oryzihabitans	1,787
F1		60	Pseudomonas oryzihabitans	1,778
F5		64	Pseudomonas oryzihabitans	1,887
H11		E coli	Escherichiacoli	2,056

Campo de combava

Numero de muestra en la siembra	Número de identificación de la muestra	Nombre del organismo	Fiabilidad
A1	E_Coli	Escherichiacoli	2,267
A2	1	Pseudomonas koreensis	1,986
A3	2	Pseudomonas koreensis	1,94
A5	4	Pseudomonas oryzihabitans	1,772
A6	5	Pantoeaagglomerans	1,841
A7	6	Bacilluscereus	2145
A8	7	Pseudomonas koreensis	1,95
A9	8	Pseudomonas koreensis	2,013
A10	9	Stenotrophomonas rhizophila	2,081
A11	10	Pseudomonas oryzihabitans	1,952
A12	11	Enterobactercowanii	1,95
B1	12	Bacilluscereus	2,014
B2	13	Pseudomonas rhodesiae	2,418
B3	14	Pantoeaagglomerans	2,294
B4	15	Pantoeaagglomerans	2,334
B5	16	Pantoeaagglomerans	2,375
B6	17	Pantoeaagglomerans	1,871
B7	18	Pantoeaagglomerans	1,934
B9	20	Curtobacteriumflaccumfaciens	1,765
C1	24	Bacillusweihenstephanensis	2,027
C6	29	Curtobacteriumflaccumfaciens	1,953
C7	30	Curtobacteriumflaccumfaciens	2,038
C8	31	Curtobacteriumflaccumfaciens	2,111
C9	32	Pseudomonas oryzihabitans	1,851
C10	33	Pseudomonas oryzihabitans	1,866
C11	34	Pantoeaagglomerans	2,194
C12	35	Pantoeaagglomerans	2,048
D1	36	Xanthomonas citri	2,111
D2	37	Xanthomonas citri	2,061
D5	40	Curtobacteriumflaccumfaciens	2,059
D6	41	Curtobacteriumflaccumfaciens	2,017
D7	42	Kocuriakristinae	2,322
D8	43	Curtobacteriumflaccumfaciens	1,853
D12	47	Sphingomonasphyllosphaerae	1,807
E2	49	Pseudomonas oryzihabitans	1,854
E3	50	Pseudomonas oryzihabitans	1,862
E6	53	Sphingomonasaurantiaca	1,734
E8	55	Pseudomonas koreensis	2,018
E9	56	Pseudomonas koreensis	2,058

F3	62	<i>Sphingomonasaerolata</i>	1,951
F4	63	<i>Sphingomonasfaeni</i>	1,851
F5	64	<i>Sphingomonasfaeni</i>	1,823
F6	65	<i>Bacilluscereus</i>	2,003
F7	66	<i>Bacilluscereus</i>	2,188
F8	67	<i>Sphingomonasyunnanensis</i>	1,97
F9	68	<i>Methylobacteriummesophilicum</i>	2,25
G8	79	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,744
H12	E_Coli	<i>Escherichiacoli</i>	2,18

ANEXO 2: Descripción de la morfología de las bacterias Saprofitas

Tangor						
Medio de cultivo	Colonia	Tamaño	Diámetro	Textura	Color	
3/[+1]/300ppm	1	Mediano	2-3mm	Mucosa	Blanco	
	2	Mediano	4-5mm	Mucosa	Amarillo	
	3	Mediano	2-3mm	Mucosa	Verdeoscuro	
	4	Mediano	2mm	Mucosa	Amarillo	
	5	Mediano	2-3mm	Rugosa	Blanco	
	6	Pequeño	1mm	Mucosa	Amarillo	
	7	grande	5-6mm	Mucosa	Amarillo	
3/[+1]/200ppm	8	grande	5-6mm	Mucosa	Amarillo	
4/[+1]/300ppm	9	Mediano	2-3mm	Mucosa	Amarillo	
	10	MuyPequeño	<1mm	Mucosa	Amarillo	
4/[+1]/200ppm	11	Mediano	3-4mm	Arrugado	Amarillo	
5/[+1]/300ppm	12	Grande	6-7mm	Mucosa	Amarillo	
	13	Grande	5mm	Mucosa	Amarillo	
5/[+1]/250ppm	15	Pequeño	1-2mm	Rugosa	Amarillo	
2/[+1]/300ppm	16	Mediano	2-3mm	Mucosa	Amarillo	
	18	Mediano	2-3mm	Mucosa	Amarillo	
2/[+1]/250ppm	19	Mediano	2-3mm	Rugosa	Amarillo	
	20	Mediano	2-4mm	Mucosa	Amarillo	
2/[+1]/300ppm	21	Mediano	3-4mm	Rugosa	Amarillo	
2/[+1]/250ppm	22	Mediano	3-4mm	Mucosa	Amarillo	
1/T-	23	Pequeño	<1mm	Mucosa	Amarillo	
1/[+1]/200ppm	24	Mediano	3-4mm	Rugosa	Amarillo	
3/[+1]/CYE	25	Pequeño	1mm	Mucosa	Amarillo	
	26	Pequeño	1mm	Mucosa	Amarillo	
	27	Pequeño	<<1mm	Mucosa	Amarillo	
	28	Pequeño	<<1mm	Mucosa	Amarillo	
	29	Pequeño	<<1mm	Mucosa	Amarillo	
	30	Pequeño	<<1mm	Mucosa	Amarillo	
	31	Pequeño	<<1mm	Mucosa	Amarillo	
2/[0]/300ppm	32	Pequeño	1-2mm	Mucosa	Amarillo	
	33	Mediano	3-4mm	Mucosa	Amarillo	
2/[-1]/300ppm	34	Mediano	3-4mm	Mucosa	Amarillo	
2/[+1]/300ppm	35	Pequeño	<1mm	Mucosa	Amarillo	
4/[0]/300ppm	36	Mediano	2-3mm	Mucosa	Amarillo	
3/[0]/300ppm	37	Grande	6-7mm	Mucosa	Amarillo	
5/[+1]/300ppm	38	Pequeño	<1mm	Mucosa	Amarillo	

Combawa						
Medio de cultivo	Colonia	Tamaño	Diámetro	Textura	Color	
4/[+1]/300ppm	1	Muygrande	1cm	Mucosa	Blanco	
	2	Mediano	3mm	Mucosa	Blanco	
	3	Mediano	2mm	Mucosa	Amarillo	
	4	Mediano	2mm	Rugosa	Amarillo	
	5	Muygrande	1cm	Mucosa	Amarillo	
5/[+1]/300ppm	6	Grande	5-6mm	Mucosa	Blanco	
	7	Grande	5-6mm	Mucosa	Amarillo	
3/[0]/300ppm	8	Mediano	4-5mm	Mucosa	Marrón	
	9	Mediano	4-5mm	Mucosa	Marrón	
	10	Grande	6-8mm	Mucosa	Amarillo	
	11	Mediano	3-4mm	Mucosa	Blanco	
	12	Mediano	2-3mm	Mucosa	Blanco	
	13	Grande	5-6mm	Mucosa	Blanco	
2/[0]/300ppm	14	Pequeño	1mm	Mucosa	Marrón claro	
	15	Pequeño	1mm	Mucosa	Marrónoscuro	
	16	Pequeño	1mm	Mucosa	Amarillo	
	17	Mediano	2-3mm	Rugosa	Blanco	
1/[+1]/300ppm	18	Grande	7-8mm	Mucosa	ocre	
	19	Pequeño	2mm	Dura	Blanco	
	20	Pequeño	2mm	Mucosa	Naranja	
	21	Mediano	3-4mm	Dura	Verde	
	22	Pequeño	1mm	Mucosa	Amarillo	
	23	Pequeño	<1mm	Mucosa	Rosa	
	24	Mediano	2mm	Mucosa	Amarillo	
	25	Mediano	5mm	Rugosa	Amarillo	
	26	Mediano	3-4mm	Mucosa	Naranja	
27	Pequeño	2mm	Mucosa	Naranja		
4/[+1]/CYE	28	Mediano	3mm	Mucosa	Verde	
	29	Pequeño	<1mm	Mucosa	Rosa	
4/[-1]/CYE	30	Pequeño	<1mm	Mucosa	Azul	
4/[-1]/300ppm	31	Pequeño	1mm	Mucosa	Naranja	
	32	Pequeño	1-2mm	Rugosa	Naranja	
5/[-1]/300ppm	33	Pequeño	2mm	Mucosa	Amarillo	
	34	Grande	6-7mm	Mucosa	Blanco	
	35	Pequeño	<1mm	Mucosa	Amarillo	
	36	MuyPequeño	<<1mm	Mucosa	Azul	
3/[0]/300ppm	37	Mediano	5mm	Mucosa	Amarillo	
	38	Mediano	3-4mm	Mucosa	Azul	
	39	Pequeño	<1mm	Mucosa	Marrón	
	40	Pequeño	2mm	Mucosa	Verde	