

**INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) A
Candidatus Liberibacter solanacearum, MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
ALCAMIDAS.**

MARIANA BELTRAN BEACHE

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA
“ANTONIO NARRO”
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA.**

MAYO DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN TOMATE (*Solanum Lycopersicum* L.) A
Candidatus Liberibacter solanacearum, MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
ALCAMIDAS.

TESIS

PRESENTADA POR

MARIANA BELTRAN BEACHE

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal

Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Asesor

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor

Dra. Susana González Morales

Asesor

Dr. Rodolfo Velásquez Valle

Dr. Fernando Ruiz Zárate
Subdirector del Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila; México, Mayo de 2014.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de asesores; Dr. Alberto Flores Olivas, Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, Dra. Susana González Morales, Dr. Alberto Benavides Mendoza y Dr. Rodolfo Velásquez Valle, y a todas aquellas personas que con sus contribuciones intelectuales y en especie hicieron posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi hija Mariana Delgado Beltran, por alegrar cada día con tu peculiar sonrisa. A mis padres Margarita Beache y José Beltrán, y especialmente al mejor compañero de trabajo y de vida, Juan Carlos Delgado.

COMPENDIO

**Inducción de resistencia en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) A
Candidatus Liberibacter solanacearum, Mediante la aplicación de
alcamidas.**

POR

MARIANA BELTRAN BEACHE

**MAESTRO EN CIENCIAS
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 2013**

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS -Asesor-

Palabras clave: Inducción de resistencia, alcamidas, *Candidatus liberibacter solanacearum*.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial y la tercera especie hortícola de mayor producción en México, cultivándose anualmente cerca de 55,237.38 Ha, con un valor de producción mayor a los 13 millones de pesos (FAO, 2014; SIAP, 2014). Una limitante en la producción de tomate, es la presencia de enfermedades de importancia económica. Recientemente, se ha reportado la presencia de la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum* (CLso) afectando cultivos de solanáceas, cuyo vector es el psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc). Esta bacteria ha causado pérdidas millonarias en invernaderos comerciales de tomate en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2009), afectando otras hortalizas como papa, chile, tomatillo y zanahoria en varios países (EPPO, 2013). La búsqueda de especies o variedades resistentes o tolerantes parece ser la única alternativa de control de la bacteria, desafortunadamente aún no se tienen reportes favorables (Munyanza *et al.* 2011). La inducción de resistencia en las plantas es un método alternativo para la protección de estas, basado en la estimulación de los mecanismos naturales de defensa en los tejidos. La aplicación exógena de alcanidas tiene una interferencia recíproca entre rutas de señalización relacionadas con la respuesta de defensa de las plantas (Halitschke *et al.*, 2001), modulando las respuesta de defensa a través del control de la biosíntesis y señalización del ácido jasmónico (Méndez, 2012), confiriendo resistencia a hongos como *Botrytis cinérea* e insectos como *Manduca sexta*. El objetivo de este trabajo es evaluar y caracterizar la capacidad elicitora de las alcanidas naturales en la activación de señales de defensa en el patosistema: tomate-*Candidatus liberibacter solanacearum*. El desarrollo del experimento consistió en aplicación de alcanidas naturales como inductores de resistencia, en plantas de tomate inoculadas con la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum*, utilizando como vector adultos de *B. cockerelli*. Se caracterizó fenotípicamente la respuesta de las plantas ante la presencia de la bacteria y de las alcanidas; y se evaluó la expresión de los genes JAZ, PR1, MYC2 y TGA, genes involucrados en la biosíntesis de ácido jasmónico y ácido salicílico. Se obtuvo un porcentaje de inoculación efectiva de la bacteria del 70.7% y se caracterizó fenotípicamente la

sintomatología asociada a la enfermedad causada por *Candidatus liberibacter solanacearum* y a la aplicación de alcaloides naturales como inductores de resistencia en tomate. El tipo de resistencia inducida se asoció a SAR debido a la expresión de los genes *JAZ* y *PR1*, que participan en la ruta de la biosíntesis de ácido salicílico.

COMPENDIO

**Inducción De Resistencia En Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) A
Candidatus Liberibacter solanacearum, Mediante La Aplicación De
Alcamidas.**

POR

MARIANA BELTRAN BEACHE

**MAESTRO EN CIENCIAS
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MAYO 2014**

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS -Asesor-

**Palabras clave: Inducción de resistencia, alcamidas, *Candidatus*
liberibacter solanacearum.**

Tomato (*Solanum lycopersicum* L) is the second vegetable produced in the world and the third vegetable in Mexico, around 55,237.38 Ha. are cultivated annually. Whose production value exceeds 13 million of pesos (FAO, 2014; SIAP, 2014). A limiting factor in tomato production is the presence of diseases of economic importance. Recently, are reported the presence of the bacterium *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) affecting solanaceous crops, which vector is the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). This bacterium has caused huge losses in commercial tomato greenhouses in Nueva Zelanda (Lieferting *et al.*, 2009) and affecting other vegetables such as potatoes, capsicum and carrot in several countries (EPPO, 2013). The search for resistant or tolerant species or varieties seems to be the only alternative to control of the bacteria, unfortunately not yet have favorable reports (Munyanza *et al.*, 2011). The induction of resistance in plants is an alternative method for the protection of these, based on the stimulation of the natural defense mechanisms in tissues. Exogenous application of alkaloids has a reciprocal interference between signaling pathways related to the defense response of plants (Halitschke *et al.*, 2001), modulating the defense response through control of the biosynthesis and signaling of jasmonic acid, conferring resistance to fungi such as *Botrytis cinerea* and insects such as *Manduca sexta* (Mendez, 2012). The objective of this work is to evaluate and characterize the elicitor capacity of natural alkaloids for activation of signals defense in pathosystem: *Candidatus Liberibacter solanacearum* - tomato. The development of the experiment involved the application of natural alkaloids as inducers resistance on tomato plants inoculated with the bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum*, by using adults of *B. cockerelli*. Were phenotypically characterized the response of the plants in the presence of the bacteria and alkaloids and the expression of the JAZ, PR1, MYC2 and TGA genes was evaluated, genes are involved in the biosynthesis of salicylic acid and jasmonic acid. The effective inoculation percentage obtained of the bacteria was 70.7 % and the symptoms associated with the disease caused by *Candidatus Liberibacter solanacearum* and application of natural alkaloids as inducers of resistance in tomato was phenotypically characterized. The type of induced

resistance was associated with SAR due to the expression of the PR1 and JAZ genes, involved in the biosynthesis pathway of salicylic acid.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS.....	Xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
El cultivo del tomate.....	3
Principales plagas y enfermedades del tomate.....	3
Origen y características de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum.....	4
Ubicación taxonómica de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum.....	5
Importancia económica.....	6
Transmisión.....	6
Epidemiología.....	7
Métodos de diagnóstico.....	8
Diagnóstico macroscópico.....	8
Diagnóstico microscópico.....	10
Diagnóstico bioquímico.....	10
Diagnóstico serológico.....	10
Diagnóstico molecular.....	11
Manejo.....	12
Cultural.....	13
Biológico.....	13
Químico.....	14
Desarrollo de variedades resistentes.....	14
Inducción de resistencia en plantas.....	15
Resistencia sistémica adquirida (SAR)	16
Mecanismos de resistencia dependientes de ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET)	17
Resistencia sistémica inducida (ISR)	18
Expresión de genes relacionados con la inducción de resistencia	19
Gen MYC2.....	20
Gen JAZ.....	21
Gen TGA.....	22
Gen PR1.....	22
Inductores de resistencia.....	24
Las alcalmidas.....	27
OBJETIVOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA.....	47
ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
Tabla 1	Iniciadores reportados para la amplificación de la región 16SrRNA de CLso. Mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Tomado de Flores (2013).....	12
Tabla 2	Moléculas y/o sustancias inductoras de resistencia y patógenos controlados.....	24
Tabla 3	Cambios presentes en cada tratamiento de acuerdo a la evolución de la sintomatología asociada a la presencia de la bacteria.....	38
Anexo 2	Protocolo RT-PCR con SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de INVITROGEN®.....	60
Anexo 3	Resultados obtenidos de la incidencia en cada una de las repeticiones de los tratamientos inoculados y nivel de severidad de acuerdo a la escala propuesta.....	61
Anexo 4	Índice de la enfermedad en cada tratamiento.....	63
Anexo 5	Prueba de normalidad y análisis estadístico mediante la prueba t estudent $p=0.05$ para el índice de severidad de acuerdo a la escala propuesta.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
Figura 1	Resultados positivos a la presencia de CLso en insectos, banda amplificada de 1070pb, utilizando un marcador de peso molecular de 100-3000pb. P1 insectos portadores de bacteria tomados de la colonia establecida.....	35
Figura 2	Identificación de CLso en cada uno de los tratamientos....	36
Figura 3	Escala propuesta de acuerdo a la sintomatología expresada por la infección de la bacteria. A) nivel 0; B) nivel1; C) nivel 2; D) nivel 3; E) nivel 4; F) nivel 5; G) nivel 6; H) nivel 7; I) nivel 8; J y K) nivel 9 y L) nivel 10.....	40
Figura 4	Comparación de medias de la severidad de los daños causados por CLso en los tratamientos inoculados. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (T student, p=0.05, SAS 9.0).....	41
Figura 5	Productos de amplificación de RT-PCR para el gen JAZ...	42
Figura 6	Productos de amplificación de RT-PCR para el gen PR1..	42

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial y la tercera especie hortícola de mayor producción en México, cultivándose anualmente cerca de 55,237.38 Ha, con un valor de producción mayor a los 13 millones de pesos (FAO, 2014; SIAP, 2014).

Una limitante en la producción de tomate, es la presencia de enfermedades de importancia económica que merman la producción y aumentan los gastos de inversión. Recientemente, se ha reportado la presencia de una bacteria vascular nombrada *Candidatus liberibacter solanacearum* (CLso), afectando cultivos de solanáceas, cuyo vector es el psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). Esta bacteria ha causado pérdidas millonarias en invernaderos comerciales de tomate en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2009), y en otras hortalizas como papa, chile, tomatillo y zanahoria en varios países (EPPO, 2013). En México se ha confirmado la presencia de Clso en el cultivo de tomate en Sinaloa y el Estado de México (Ling *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009a), en chile en Sinaloa y Michoacán y en papa en Coahuila, Estado de México, Guanajuato y Puebla (DGSV-CNRF, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009b; Rubio-Covarrubias *et al.*, 2011). Las características biológicas de la bacteria, limitan el control de la enfermedad solo contra el vector. La búsqueda de especies o variedades resistentes o tolerantes parece ser la única alternativa de control de la bacteria, desafortunadamente aún no se tienen reportes favorables (Munyaneza *et al.* 2011).

La inducción de resistencia en las plantas es un método alternativo para la protección de estas, basado en la estimulación de los mecanismos naturales

de defensa en los tejidos. La inducción de resistencia se describe en dos niveles: el primero es la defensa activa ante un raza o aislado de un patógeno incompatible, que se caracteriza por la expresión altamente localizada de defensas como las fitoalexinas y una respuesta de hipersensibilidad; el segundo, las plantas expresan resistencia a un amplio rango de patógenos compatibles, después de un tratamiento inductor inicial. Tras el tratamiento con algún inductor, la planta activa diversos mecanismos de defensa que le pueden conferir resistencia al ataque futuro de virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos. Se han identificado tres vías que se activan como mecanismos de defensa inducidos, una dependiente de ácido salicílico (AS), la segunda de ácido jasmónico (AJ) y la tercera de etileno (ET). La vía dependiente de AS puede ser inducida por patógenos necrosantes, que inducen resistencia sistémica adquirida (SAR) que proporciona protección contra una amplia gama de patógenos. La vía dependiente de AJ y ET proporciona resistencia contra un gran número de patógenos, insectos y hongos necrotróficos. La tercera vía resistencia sistémica inducida (ISR) también depende de AJ y ET y es inducida por algunas especies de rizobacterias promotoras de crecimiento no patógenas (PGPR) (Custers, 2007). La aplicación en la superficie de la planta de inductores o elicitores exógenos ya sea bióticos o abióticos generalmente desarrollan resistencia al hospedante activando múltiples rutas de señalización de defensa intracelular (Holopainen *et al.*, 2009). La aplicación exógena de alcanidas tiene una interferencia recíproca entre rutas de señalización relacionadas de JAs y Alcanidas (Halitschke *et al.*, 2001), modulando respuestas de defensa, a través del control de la biosíntesis y señalización del AJ, confiriendo resistencia a hongos como *Botrytis cinérea* e insectos como *Manduca sexta* (Méndez, 2012).

En base a lo anterior en este trabajo se pretende evaluar y caracterizar la capacidad elicitora de las alcanidas naturales en la activación de señales de defensa en el patosistema: tomate-*Candidatus liberibacter solanacearum*.

REVISIÓN DE LITERATURA

El cultivo del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial y la tercera especie hortícola de mayor producción en México, cultivándose anualmente cerca de 55,237.38 Ha, con un valor de producción mayor a los 13 millones de pesos (FAO, 2014; SIAP, 2014).

Principales plagas y enfermedades del tomate

Un gran reto para la producción de tomate a cielo abierto y bajo sistemas protegidos es la presencia de variadas enfermedades de importancia económica que merman la producción y aumentan los gastos de inversión del cultivo.

Entre las principales patógenos y plagas que atacan al tomate se encuentran el cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis*, pudriciones por *Botrytis cinérea* y *Botryotinia fuckelina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora parasítica*, *Alternaria solani*, cenicilla (*Leveillula taurica* y *Oidiopsis Simula Scadia*), Damping off por *Rhizoctonia solani*, *Phythium* spp. y *Fusarium* spp., infecciones bacterianas por especies de *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. Entre las plagas más importantes destacan la mosca blanca (*Bemisia* y *Trialeurodes*) que son capaces de transmitir más de 25 virus, el ácaro *Aculops lycopersici*, la araña roja *Tetranychus urticae* y el psílido *Bactericera cockerelli* (Oyoque, 2008; CEICKOR, 2010), importante por los daños que causa a la planta y como transmisor de patógenos.

Recientemente, se ha reportado la presencia de una bacteria vascular tentativamente nombrada *Candidatus liberibacter solanacearum*, afectando cultivos de solanáceas, cuyo vector es el psílido *Bactericera cockerelli* (Bc) (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). Esta bacteria ha causado pérdidas de millones de dólares en invernaderos comerciales de tomate en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2009) y en otras hortalizas como papa, chile, tomatillo y zanahoria en varios países (EPPO, 2013).

Origen y características de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

En el estado de Guanajuato se reportó por primera vez en 1984 la existencia de una enfermedad denominada “permanente del tomate” (PT), la cual causó 60% de daños en la producción del cultivo (Garzón, 1984; Garzón, *et al.*, 1986; Munyaneza, 2009b). Posteriormente, Secor y Rivera (2004) demostraron que una nueva especie de bacteria no cultivable denominada *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso), era la responsable de la enfermedad “Permanente del tomate” (en conjunto con algunos fitoplasmas), este patógeno también está asociado a la enfermedad denominada “Punta morada de la papa” o Zebra chip (ZC), reportada por primera vez en 1994 en Saltillo, México, y el variegado del chile (Munyaneza *et al.*, 2007a, 2009a, 2009b; Hernández, 2013).

Se han reportado cuatro especies del género *Liberibacter*, de las cuales tres afectan cítricos; *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus* causando la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB, “Dragón amarillo” en español), considerada como la más importante a nivel mundial en estos cultivos (Roy y Brlansky, 2009), son transmitidas por *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. La cuarta especie *Candidatus Liberibacter solanacearum* (sin. *psyllauros*) afecta plantas la familia *Solanaceae* y *Apiaceae* y a diferencia de las tres primeras es transmitida por *Bactericera cockerelli* y no se presenta en Rutáceas (Liefting *et al.*, 2009a). Se ha detectado en todas las regiones productoras de papa de México, como infección simple o mezclada con

fitoplasmas. En base a polimorfismos de nucleótido simple del gen 16SrRNA, de la región espaciadora intergénica 16S/23S y genes de la proteína ribosomal 50s rplJ y rplL, se han determinado el haplotipo “LsoA” en el Oeste de México, el haplotipo “LsoB” en el Este de México, el haplotipo “LsoC”, asociado a zanahoria en Finlandia transmitido por *Trioza apicalis* y el haplotipo “LsoD” asociado a zanahoria en España e Islas Canarias, transmitido por el psílido *Bactericera trigònica* (Nelson *et al.*, 2013).

Candidatus Liberibacter solanacearum es una bacteria Gram-negativa, parásita obligada del floema en solanáceas y no cultivable *in vitro* (Jagoueix *et al.*, 1994; Bové, 2006). La morfología de las especies de “*Candidatus Liberibacter*” se observa en forma de varilla (similar a un bacilo) bajo microscopia electrónica (Tanaka *et al.*, 2007) y miden aproximadamente 0.2µm de ancho y 4µm de largo. Al igual que otras bacterias del género liberibacter, se puede transmitir por injerto e insectos vectores (Liefting *et al.*, 2009a; Secor *et al.*, 2009; Crosslin y Munyaneza, 2009). En México es responsable de la enfermedad “Permanente del tomate”, “Punta morada de la papa” (ZC) y algunos daños en chile, cuyos síntomas aéreos son similares en las tres especies (Munyaneza *et al.*, 2007a, 2009a, 2009b).

Ubicación taxonómica de *Candidatus liberibacter solanacearum*

Dominio: Bacteria

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Phyllobacteriaceae

Género: *Candidatus Liberibacter*

Especie: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (sin. *psyllauros*) (CAB International, 2012).

Importancia económica

Las infecciones ocasionadas por *Candidatus Liberibacter solanacearum* reducen la calidad del producto y su valor comercial en el mercado. CLso ha causado pérdidas millonarias en la industria de la papa (SINVEF, 2012); por el abandono de los campos de siembra así como por la merma en la producción y calidad del cultivo, que pueden alcanzar hasta el 100%. En tomate, reduce el rendimiento de la producción en un 60% (Garzon, 1984) si se presenta sola, o hasta el 100% si se presenta en conjunto con fitoplasmas o infecciones por virus (Hernández, 2013). Además, se aumentan los gastos de manejo del cultivo y control del vector (Gudmestad y Secor, 2007).

Transmisión

El principal vector de CLso es *Bactericera cockerelli* (Sulc. 1909) o el psílido de la papa y/o del tomate, anteriormente llamada *Paratrioza cockerelli* (Crawford. 1991); esta es una plaga de importancia económica, que afecta a las plantas principalmente por su mecanismo de alimentación, el cual consiste en un aparato bucal tipo picador-chupador, que está armado con un estilete formado por dos conductos, uno de entrada y otro de salida. En la planta, las ninfas y/o adultos introducen el estilete hasta el floema; por uno de los conductos el insecto succiona la savia y por el otro inyecta su saliva a la planta. La alimentación de este, produce amarillamiento de las hojas, entrenudos acortados engrosados, retraso del crecimiento de las plantas y tamaño del fruto reducido (Nachappa *et al.*, 2012). Este tipo de daño corresponde al daño directo de tipo toxinífero causado por el insecto, pudiendo causar daños indirectos por la transmisión de procariontes y fitoplasmas (Garzón *et al.*, 2005). Los síntomas causados por el daño directo de psílido se denominan amarillamiento de la papa y son causados por una toxina salival según Carter (1993). Dentro de los daños secundarios, uno de los principales patógenos que se transmite es *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Secor y Rivera, 2009; Liefting *et al.*, 2009b). La bacteria, CLso,

contribuye a agravar los síntomas del amarillamiento causado por la alimentación de psílido; además de causar los daños por el consumo de nutrientes de la planta y la multiplicación de la bacteria. El insecto vector y la bacteria tienen similar rango de hospederos, siendo los principales las solanáceas (Lieferting *et al.* 2009b).

La transmisión de CLso por *Bactericera* es de forma vertical, con período de incubación de hasta 24 h y tiempo de transmisión promedio de 15 min, no requiere de un hospedero silvestre para multiplicarse, como algunos virus fitopatógenos. La edad fisiológica del vector no influye en la capacidad para transmitir la bacteria, pero en el caso de *B. cockerelli* las ninfas requieren menor tiempo (15 min) que los adultos (30 min) para adquirir CLso según Garzón (2009). Todos los estadios transmiten CLso con una eficiencia del 100%, excepto los adultos, estos tienen una capacidad de transmisión de 78% (Casteel, 2012).

El psílido del tomate mantiene una relación simbiótica con la bacteria CLso, siendo esta un endosimbionte que se instala en el intestino del vector y le ayuda a desdoblar carbohidratos para su fácil asimilación. Además CLso se ve involucrada en la mayoría de los procesos de desarrollo del insecto, se ha reportado que la presencia de la bacteria activa genes implicados en el metabolismo, la reproducción, el desarrollo, la activación de la respuesta al estrés y la respuesta inmune (Nachappa, 2012). CLso es un simbiote hereditario en *B. cockerelli* (Baumann, 2005).

Epidemiología

Munyanza *et al.*, (2011) indican que la temperatura es un factor importante en el desarrollo de los síntomas por infecciones de *Candidatus liberibacter solanacearum*. Indican que temperaturas por debajo de 17°C retardan el desarrollo de la bacteria y los síntomas de la enfermedad, y temperaturas superiores a los 32°C son perjudiciales para la bacteria, dado que es sensible a

las altas temperaturas. La temperatura tiene un impacto significativo en la biología y las migraciones del vector, lo que sugiere una coevolución entre *Candidatus L. solanacearum* y *B. cockerelli* (LANREF, 2013).

Las liberibacterias se dispersan de una planta enferma a una planta sana por injerto o insecto vector (Bové, 2006; Tanaka *et al.*, 2007). *B. cockerelli* es el principal vector de este patógeno, el cual puede ser transmitido por injerto pero no mecánicamente. Esta enfermedad no ha sido reportada en zonas fuera de aquellas donde se encuentra el vector, lo que indica que son áreas delimitadas por las condiciones de desarrollo del insecto (LANREF, 2013).

Métodos de diagnóstico

Diagnóstico Macroscópico

Los síntomas causados por la bacteria varían según el cultivar y la etapa de crecimiento del hospedante, consisten principalmente en amarillamientos y deformación de la lámina foliar (Khairulmazmi *et al.*, 2008), relacionados con la obstrucción de los vasos conductores del floema provocado por la presencia de CLso. La savia no se transloca normalmente en la planta, sino que se acumula en los plastidios de las células del parénquima en empalizada de las hojas, mientras que a semillas y frutos llega en bajas cantidades (Schneider, 1968). En papa los tubérculos infectados con CLso generalmente no brotan, y si lo hacen, producen brotes ahilados y plantas débiles, con reducidas posibilidades de supervivencia (Munyaneza *et al.*, 2007a; Secor *et al.*, 2009).

Las plantas de papa infectadas con CLso, presentan retraso en el crecimiento y clorosis; la parte superior muestra entrenudos hinchados, proliferación de yemas axilares, brote de tubérculos aéreos, oscurecimiento del sistema vascular, tizón en hoja y muerte temprana de la planta, dependiendo del estado fisiológico en que se presenta la infección (Munyaneza *et al.*, 2007b). Los

tubérculos infectados muestran lenticelas agrandadas en el tallo subterráneo, colapso de estolones, lesiones color marrón en el anillo vascular, necrosis en los tejidos internos y ocasionalmente rayado color marrón en el tejido medular (Munyanenza *et al.*, 2007a). Las papas fritas que se procesan a partir de tubérculos infectados presentan un patrón de bandas oscuras y claras, a menudo este rayado se puede detectar en el tubérculo fresco. Hay indicaciones de que los síntomas de ZC pueden desarrollarse en los tubérculos durante su almacenamiento. (Munyanenza *et al.*, 2007a; Secor *et al.*, 2009).

Munyanenza *et al.*, (2009a) reportaron por primera vez la presencia de síntomas similares al “permanente del tomate”, enfermedad comúnmente asociada a fitoplasmas (Holguín *et al.*, 2007), en plantas de tomate en Sinaloa, México, cuyos síntomas mantenían una gran similitud con los causados por CLso (Liefting, 2009a). Tras un análisis, no se detectó la presencia de algún fitoplasma, mientras que la bacteria CLso estuvo presente en todas las muestras evaluadas. Los síntomas de la enfermedad denominada “permanente del tomate” (PT) causada por CLso inician con una clorosis de los brotes apicales, las hojas inferiores se enrollan tomando la apariencia de “taco” y presentan una textura quebradiza. En las flores se manifiesta necrosis y son abortadas. Las plantas son pequeñas y de un color verde más intenso que las normales (Garzón, 1984 y 1986; Munyanenza *et al.*, 2009a).

Las plantas de chile infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum* muestran crecimiento apical clorótico o color verde pálido, adelgazamiento del ápice de las hojas, entrenudos cortos y retraso general de crecimiento (Munyanenza, *et al.* 2009b). Recientemente se ha determinado a CLso como agente causal de la enfermedad denominada variegado del chile en México (Hernández, 2013).

Diagnóstico Microscópico

La morfología de las especies de “Candidatus Liberibacter” se observa en forma de varilla (similar a un bacilo) bajo microscopia electrónica. Es de aproximadamente 2-3 μm de largo, 0.2-0.3 μm de ancho, con extremos redondeados y con una superficie exterior suave, lo cual indica que no poseen una membrana externa por lo que la pared de peptidoglicanos es apenas visible (Tanaka *et al.*, 2007), haciéndola negativa a la tinción de Gram. No hay evidencia física de la presencia de flagelos o pilis, pero en el genoma de ‘Ca. L. solanacearum’ y ‘Ca. L. asiaticus’ se encuentran regiones codificantes para proteínas de ensamble de pilis y flagelos. Aun no se demuestra si CLso utiliza un aparato flagelar de locomoción dentro del hospedante, o si este solo es ensamblado bajo ciertas condiciones (Lin *et al.*, 2010). Su citoplasma es menos denso con respecto a otras bacterias fitopatógenas y con frecuencia muestran plasmólisis (Jagoueix *et al.*, 1994).

El diagnóstico en base a la morfología, está limitado por la inaptitud de la bacteria para ser cultivada en medios sintéticos, además de la dificultad que representa ubicar la zona exacta dentro de la planta donde se pueda encontrar esta bacteria.

Diagnóstico bioquímico

La bacteria CLso no puede ser caracterizada mediante técnicas bioquímicas, razón por la cual se le ha asignado el término de “Candidatus” (Murray y Schleifer, 1994; Murray y Stackebrandt, 1995).

Diagnóstico serológico

Se han logrado obtener varios anticuerpos monoclonales (AcM) específicos para bacterias de “Candidatus liberibacter” causantes de la

enfermedad denominada Huanglongbing (HLB) en cítricos, usando como antígenos cepas asiáticas y africanas (Villechanoux *et al.*, 1990; Garnier *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1991). La producción de AcM no ha sido eficiente para la detección de las diferentes especies del género *liberibacter* debido a su alta especificidad respecto a la cepa contra la que son dirigidos. Es por ello que se requiere de un estudio más profundo para la búsqueda de epítopes comunes a todas las formas conocidas de la bacteria, con el fin de generalizar su aplicación para el diagnóstico (Collazo *et al.*, 2008).

Diagnóstico molecular

Hasta la fecha y a partir del primer reporte de CLso como agente causal de enfermedades como ZC y PT (Secor y Rivera, 2004), el diagnóstico de esta bacteria se ha dirigido solo a la identificación de fragmentos de ADN del genoma bacteriano mediante PCR. La PCR es la técnica más utilizada debido a la especificidad y rapidez con que se realiza. La detección mediante PCR de “*Candidatus liberibacter*” está dirigida a la amplificación de la región 16S rADN de su genoma (Jagoueix *et al.*, 1994; Texeira *et al.*, 2005), para la cual se ha diseñado varios iniciadores específicos (Tabla 1). Jagoueix *et al.* (1994) diseñaron el oligonucleótido universal OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3), que se usa en combinación con oligos específicos para la detección de las diferentes especies de “*Candidatus liberibacter*”.

El oligo más utilizados para el diagnóstico de CLso es OI2C (Jagoueix *et al.*, 1994) y complementarios a éste Cli.po.F (Secor *et al.*, 2009) y LsoF (Munyanza *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009). Algunos pares de oligos han sido diseñados específicamente para CLso como LsoadkF (5'-GCGCCACACTAACATCTCCTTCC-3) y LsoadkR (5'-CGCAGCAGTATGAGGGCC-3') que amplifica la región 16S rADN; y el par de oligos Btub1F (5'-TGATTTCCAAGGTAAGGGAGGA-3') y Btub1R (5'-

CATGTTGCTCTCGGCTTCAG-3') dirigidos a la amplificación de la región codificante de β -tubulina de la papa (Ravindran *et al.*, 2011).

Tabla 1.- Iniciadores reportados para la amplificación de la región 16SrRNA de CLso. Mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Tomado de Flores (2013).

Iniciador	Secuencia	Región	Fragmento
OA2	5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3'	16SrRNA	1160 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3,		
CLi.po.F	5'-TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT-3	16S rDNA	1070 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
ZCf	5'-CGAGCGCTTATTTT ATTAGGAGC-3'	16S rDNA	1171 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
Lp Frag4-1611F	5-GGTTGATGGGGTCAATTTGAG-3	ISR-parcial	918 pb.
LP Frag 4- 480R	5- CACGGTACTGGTTCACATATCGGTC-3	16S rRNA- 23S rRNA	
OA2	5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3'	16SrRNA	1160 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3,		
Lib16S01F(anidado)	5'-TTCTACGGGATAACGCACGG-3'		580-pb
Lib16S01R	5'-CGTCAGTATCAGGCCAGTGAG-3'		
LsoF	5'-GTC GAG CGC TTA TTTT TA ATA GGA-3'	16SrRNA	1163 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
Lso TX 16/23 F	5'-AATTTAGCAAGTTCTAAGGG-3'	ITS 16S/23S rDNA	383-pb
Lso TX 16/23 R	5'-GGTACCTCCCATATCGC-3'		
PCR EN TIEMPO REAL			
LsoF	5'-GTC GAG CGC TTA TTTT TA ATA GGA-3'		
HLBr	5-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3		
COX	GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A		
COXr	GCC AAA ACT GCT AAG GGC ATT C		
Sonda HLBP	56-FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/3BHQ-1		
Sonda COX	5-TET/ATC CAG ATG CTT ACG CTG G/3BHQ-2		

Manejo

El manejo óptimo de la enfermedad causada por CLso, implica el considerarla como un complejo entre el vector, el patógeno y el hospedero, así como los patógenos secundarios que aceleran el daño. El control de insectos vectores debe basarse en el muestreo y monitoreo de los insectos que arriban al cultivo, así conoceremos que insectos se encuentran en el cultivo y en qué cantidad (Flores, 2013).

Cultural

La rotación de cultivos con plantas monocotiledóneas como las gramíneas, además de otras prácticas de saneamiento son importantes para prevenir la aparición de la bacteria y su diseminación (CAB International, 2006, citado por DGSV-CNRF. 2011). Se recomienda limpiar focos de infección, como cultivos abandonados por enfermedades o residuos del cultivo, inmediatamente después de la cosecha, y eliminar plantas hospederas de la plaga o de la enfermedad en los márgenes del cultivo y lotes adyacentes (Bujanos *et al.*, 2005). Los acolchados con plástico de colores aluminio y blanco han demostrado disminuir las densidades de poblaciones de *B. cockerelli* en áreas cultivadas con tomate (Demirel y Cranshaw 2006).

Biológico

El uso de hongos entomopatógenos, insectos depredadores y parasitoides, representa una alternativa para el manejo integrado del *B. cockerelli*, en sus diferentes instares. Los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* probados solos o en conjunto con otros insecticidas (Lacey *et al.*, 2009; 2010) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Bujanos *et al.*, 2005) han demostrado ser útiles en el control de *B. cockerelli* causando mortalidades de 78-99% en condiciones de laboratorio y campo, siendo eficaces en cualquier fase de desarrollo del insecto (Lacey *et al.* 2009; 2010). Entre los enemigos naturales más eficientes se incluyen larvas de crisopa, coccinélidos, geocóridos, anthocoridos, míridos, nabidos y larvas de sírfidos, así como los insectos parasitoides *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) y *Metaphycuspsyllidis* (Hymenoptera: Encyrtidae) (Compere, 1943; Pletsch 1947).

Químico

Los insecticidas más comunes para el control de *B. cockerelli*, son thiametoxam, permetrina, esfenvalerato, imidacloprid, cyfluthrin, methamidophos, endosulfan, imidacloprid, disulfoton, phorato, spiromesifen, ciflutrin, omeotato, aldicarb y thiacloprid (Pavlista, 2002; Bayer de México, 2005). Pyriproxyfen, pymetrozine y spinosad también son de utilidad en programas de manejo integrado de plagas para *B. cockerelli* (Liu y Tumble, 2004).

Algunos productos biorracionales en el manejo de *B. cockerelli*, son kaolín, aceites minerales y de plantas, los cuales han demostrado reducir la alimentación del psílido y la oviposición (Gharalari *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2011). Algunos productos comerciales como SunSpray (mezcla de cuatro aceites esenciales de plantas) o Requiem (extracto de *Chenopodium ambrosioides*) repelen significativamente (77.2– 95.4 %) adultos del psílido de la papa y por consecuencia disminuye la ovoposición hasta en un 100% (Yang *et al.*, 2010).

La aplicación de azufre en polvo y sales potásicas de ácidos grasos (jabones insecticidas al 2%) pueden ser útiles contra ninfas, pero el control es poco confiable (Bujanos *et al.*, 2005; Cranshaw, 2007).

Desarrollo de variedades resistentes

El desarrollo e identificación de variedades resistentes o tolerantes, mediante métodos de mejoramiento genético tradicional o ingeniería genética, representan una estrategia de control eficaz y sostenible para el manejo de la enfermedad causada por CLso, desafortunadamente no se han identificado variedades o líneas avanzadas de papa (Munyanza *et al.*, 2011) o tomate con estas características. Curtis *et al.* (2010) insertaron un gen anti-insectos y dos genes antimicrobianos en papa, obteniendo una importante reducción del inóculo

bacteriano y retardando la aparición de los síntomas correspondientes a la alimentación del psílido y a los de ZC. Desafortunadamente los niveles de tolerancia expresados no representaron significancia en el control de la enfermedad. Otra opción viable es la aplicación de agentes inductores de origen químico o biológico, como las alcaloides naturales, que han mostrado resultados prometedores en la inducción de resistencia sistémica adquirida contra “*Ca. Liberibacter solanacearum*”, generando remisión de síntomas en tomate y reducción de manchado en tubérculos de papa (Flores, 2013).

Inducción de resistencia en plantas

La inducción de resistencia, es un método alternativo para la protección de las plantas, basado en la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de los tejidos.

La resistencia a patógenos o plagas puede ser activa y/o pasiva. La resistencia pasiva depende de las defensas expresadas de forma constitutiva en la planta, mientras que la resistencia activa depende de las defensas inducidas por la infección del patógeno o el ataque de la plaga. La inducción de resistencia se describe en dos niveles: El primero es la defensa activa ante un raza o aislado de un patógeno incompatible, que se caracteriza por la expresión altamente localizada de defensas como fitoalexinas, y una respuesta de hipersensibilidad; el segundo, las plantas expresan resistencia a un amplio rango de patógenos compatibles, después de un tratamiento inductor inicial (Custers, 2007).

La inducción de resistencia puede ser local o sistémica, la inducción de resistencia local, se refiere a los casos en los que el tratamiento inductor es aplicado en el tejido que posteriormente será atacado por un patógeno y su acción se enfoca en limitar el establecimiento y desarrollo del patógeno, así como su diseminación (Hammerschmidt y Nicholson, 1999). La inducción de resistencia cuya expresión es sistémica, se describe como la resistencia que es inducida en

una parte de la planta espacialmente separada del punto inicial del tratamiento inductor, el cual provoca cambios en las células a distancia, que les permite desarrollar rápidamente defensas ante el ataque de un patógeno (Conrath *et al.*, 2002). Ambas resistencias, local y sistémica, se caracterizan por la necesidad de tiempo para desarrollarse después del tratamiento de inducción, debido a la naturaleza no específica de la resistencia. La inducción de resistencia no implica la expresión o regulación de algún tipo específico de defensa (Walters *et al.*, 2007).

La mayoría de los patógenos, particularmente los específicos, son capaces de evadir las defensas constitutivas de la planta, pero estas son capaces de responder con un cambio en los mecanismos de defensa inducidos, que le pueden conferir resistencia al ataque de virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos. A la fecha, se han identificado tres vías que se activan como mecanismos de defensa inducidos, una dependiente de ácido salicílico (AS), la segunda de ácido jasmónico (AJ) y la tercera de etileno (ET). La vía dependiente de AS puede ser inducida por patógenos necrosantes, que inducen resistencia sistémica adquirida (SAR) que proporciona protección contra una amplia gama de patógenos. La vía dependiente de AJ y ET proporciona resistencia contra un gran número de patógenos, insectos y hongos necrotróficos. La tercera vía resistencia sistémica inducida (ISR) también depende de AJ y ET y es inducida por algunas especies de rizobacterias promotoras de crecimiento no patógenas (PGPR) (Custers, 2007).

Resistencia sistémica adquirida (SAR)

SAR se inicia cuando la planta es desafiada por un patógeno el cual induce una necrosis local, es inducida por una gran variedad de elicitores bióticos y/o abióticos y se caracteriza por la inducción de la producción de proteínas PR, la activación de rutas de señalización dependientes de AS y que su señal viaja sistémicamente a sitios alejados del punto de la infección (Walters *et al.*, 2007).

La señalización de AS es esencial en SAR para la activación de la respuesta de defensa local, algunas interacciones gen-por-gen (Custers, 2007) y actúa como molécula de señalización de defensa a virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Vlot *et al.*, 2008).

La activación de SAR en tejidos no infectados requiere la transmisión de señal (es) desde el tejido infectado a toda la planta, dichas señales viajan a través del sistema vascular (Dempsey & Klessig, 2012). El AS y sus derivados biológicos activos como el 0- β -Glucósido de AS (SAG), el ester de saliciloil glucosa (SGE), el metil salicilato (MeSA) y el 2,5 dihidróxido benzoico (ácido gentísico) son sintetizados ante la infección de patógenos y son capaces de inducir la expresión de proteínas PR, además de actuar como señal móvil a larga distancia en SAR (Vlot *et al.*, 2008). Otros compuestos identificados que actúan como señal móvil a larga distancia es una SFD1/GLY1 derivada de una señal dependiente de glicerol-3-fosfato (G3P), la proteína de transferencia de lípidos DIR1, ácido azelaico ácido dicarboxílico (AZA), abietano diterpenoide dehydroabietinal (DA), ácido jasmónico (AJ) y ácido pipecólico (Pip). Algunas de estas señales trabajan cooperativamente para activar SAR y/o regular el metabolismo de MeSA. Sin embargo, Pip parece activar SAR a través de una vía independiente que pueden incidir en estos otra vía (s) de señalización durante la biosíntesis de *novode*ácido salicílico (AS) en el tejido sistémico. Siendo una compleja red de señales cruzadas que interactúan para activar SAR (Dempsey & Klessig, 2012).

Mecanismos de resistencia dependientes de ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET)

El ácido jasmónico y el etileno, con frecuencia son requeridos simultáneamente para la resistencia en plantas en contra de patógenos específicos. Una muestra de ello es el requerimiento de ambas hormonas para la expresión de genes de defensa en la planta. El AJ también participa en la respuesta a heridas en la planta. ET es una hormona gaseosa que se sintetiza

como consecuencia del ataque de patógenos en interacciones compatibles e incompatibles. Ambas hormonas son requeridas para el desarrollo de ISR y forman parte de la resistencia hacia insectos y hongos patógenos (Custers, 2007).

En mutantes de *Arabidopsis* con defectos en las rutas de AJ, ET y resistencia dependiente del patógeno. Presentaron una respuesta atenuada a AJ e incremento a la sensibilidad hacia patógenos necrotróficos. Otras presentaron aumento en la sensibilidad al ataque de insectos. Además de un incremento en la susceptibilidad a bacterias virulentas, hongos biotróficos y reducción en la fertilidad (Custers, 2007).

La activación de genes de defensa dependientes de la ruta AJ como COI1 y JARD-1 fue demostrada con los patógenos *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* y el pulgón *Myzus persicae*. Los genes de defensa PDF1.2 y THI2.1 aumentan la defensa contra patógenos y proveen resistencia plagas (Ellis *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que las rutas de AS y AJ son antagónicas y ambas pueden conferir resistencia a patógenos y plagas (Koorneef y Pieterse, 2008). Aunque un estudio en mutantes de *Arabidopsis* mostró incremento en la susceptibilidad por la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Lo cual indica que la activación de los mecanismos del AJ/ET puede resultar en el incremento de la susceptibilidad hacia patógenos que fueron restringidos por SAR (Custers, 2007).

Resistencia sistémica inducida (ISR)

La colonización de la rizosfera de la planta por bacterias no patógenas, especialmente rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), es capaz de inducir resistencia para la supresión de enfermedades. A este tipo de resistencia

se le denomina inducción de resistencia sistémica (ISR), la cual no depende de la señalización de SA ni se asocia a la producción de PRs. Es similar a SAR en que la protección se activa en partes distales de la planta (Custers, 2007). El tipo de bacterias PGPR mejor caracterizadas son cepas no patógenas de especies de *Pseudomonas*, como es el caso de la cepa WCS417r, que se ha probado en plantas de *Arabidopsis* y ha inducido resistencia en contra de *P. syringae* pv. *tomato* DC300 y *Xanthomonas campestris* pv. *amoracia*, el hongo *Fusarium oxysporum* y *Alternaria brassicicola* y resistencia parcial en contra de *Hyaloperonospora parasítica*. Bacterias como *Pseudomonas putidas* y *Serratia licuefaciens* estimulan la resistencia hacia *Alternaria alternata* por la producción de N-acil-L lactosa homoserina aunado al incremento de SA (Schuhegger, 2006 citado por Custers 2007). *Bacillus pumilus* INR-7 resultó efectiva en la activación de ISR en plantas de Chile, protegiéndolas de la enfermedad de la mancha anular de la hoja y de antracnosis (Custers, 2007) Varias cepas de *Bacillus subtilis* antagonistas de patógenos fúngicos, activaron RSI en tomate contra *Meloidogine incognita*, representando una nueva alternativa para el manejo de nematodos (Adam *et al.*, 2014).

Otra hormona que participa en ISR es ABA (ácido abscísico), cuya producción es elicitada por la presencia de rizobacterias en el suelo de *Arabidopsis*, la respuesta inducida se manifiesta en una elevada producción de calosa en la raíz de la planta, también induce resistencia a *Hyaloperonospora arabidopsidis*. La respuesta por ABA también puede ser inducida mediante la aplicación de ácido β -aminobutírico (BABA).

Expresión de genes relacionados con la inducción de resistencia

En ISR, SAR y las rutas dependientes ácido jasmónico y etileno participa una gran cantidad de genes encargados de regular las respuestas de la planta ante la presencia de algún elicitador, enseguida se mencionan algunos de estos.

Gen MYC2

Los jasmonatos (JAS) son hormonas vegetales con funciones esenciales en la defensa y el desarrollo de las plantas. El factor de transcripción (TF) básico hélice-bucle-hélice (bHLH) MYC2 ha sido caracterizado como un regulador indispensable de la mayoría de los aspectos de ruta de señalización del ácido jasmónico en *Arabidopsis*. MYC2 coordina las respuestas de defensa mediadas por AJ regulando antagónicamente dos ramas diferentes de la vía de señalización de AJ que determinan la resistencia a plagas y patógenos, respectivamente. Se requiere MYC2 para la resistencia sistémica inducida (ISR) provocada por los microbios benéficos del suelo, mientras que la función de MYC2 está dirigida por agentes patógenos durante la supresión mediada por efector de la inmunidad innata en las raíces. Otra función notable de MYC2 es la regulación de interferencias entre las vías de señalización de AJ y otras fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), giberelinas (GAs) y auxinas (AIA). MYC2 también regula las interacciones entre la señalización de AJ y la luz, la señalización de fitocromos y el reloj circadiano. MYC2 está involucrado en la producción regulada de AJ para el desarrollo de la planta, la formación de raíces laterales y adventicias, el tiempo de floración y la acción de evitar la sombra. Está relacionado con los bHLH TFs MYC3 y MYC4, que corresponden a genes ortólogos que regulan funciones superpuestas y separadas de MYC2 en *Arabidopsis*. Además actúan como mediadores en la biosíntesis mediada por AJ de metabolitos secundarios (Kazan & Manners, 2013).

Una mutación de la región MYC2 en *Arabidopsis* muestra defectos en ISR inducida por rizobacterias a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 y el hongo patógeno *Hyaloperonospora parasitica*, agente causal del mildiu, esto acompañado de una elevada producción de AJ en el tejido sistémico (Truman *et al.*, 2007). Lo cual de acuerdo al estudio realizado por Hasegawa *et al.* (2011) indica que MYC2 también participa en la señalización sistémica de la resistencia

a patógenos de la raíz, principalmente cuando se produce un daño mecánico en la raíz.

MYC2 también participa en la defensa contra insectos herbívoros, controlando las rutas de defensa dependientes de AJ mediante la activación de genes insecticidas y la supresión de genes que aumentan el atractivo de la planta a los insectos (Kazan & Manners, 2013).

Gen JAZ

Los genes JAZ codifican proteínas de la familia jasmonato DOMINIO-ZIM (JAZ) la cual contiene 12 miembros (JAZ1-JAZ12) cuya función principal es la de actuar como co-receptores y represores transcripcionales en las rutas de señalización de AJ en *Arabidopsis*.

Las giberelinas (GA) son hormonas vegetales que promueven el crecimiento de las plantas y reprimen la activación de genes de defensa, en la defensa a patógenos mediada por AJ y viceversa. En este proceso participan las proteínas JAZ como represores de la mediación de AJ (Kazan & Manners, 2012).

La señalización dependiente de AJ está condicionada a la acción de una proteína COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) cuya función es promover la degradación de un regulador negativo de la transducción de la señal del AJ y genes de respuesta de defensa en las plantas a herbívoros. En este proceso intervienen los represores transcripcionales JAZ. Cuando en la planta se presentan bajos niveles de AJ, las proteínas JAZ reprimen la expresión los genes de respuesta temprana a AJ por la interacción directa con los FT. Las proteínas JAZ están implicadas en la defensa contra insectos y activan su expresión en respuesta a la presencia de AJ y heridas. Altos niveles de AJ promueven la unión de las proteínas JAZ con el complejo SCFCOI1, siendo ubiquitinadas para degradación por el complejo proteosoma 26S y permitiendo por tanto, activación

de los genes de respuesta a jasmonatos que se encontraban reprimidos por JAZ (Kazan & Manners, 2012; Fonseca *et al.*, 2009). El FT mejor descrito es MYC2, aunque se cree que existen otros FTs que activan la expresión de los genes JAZ (Demianski *et al.*, 2012; Kazan & Manners, 2012).

Gen TGA

La familia de factores de transcripción TGA (bZIP) se ven involucrados en la regulación de las respuestas de defensa de las plantas. Se han identificado 10 FT TGA en *Arabidopsis* de los cuales siete han sido caracterizados de acuerdo a su interacción con NPR1. Los siete se han dividido en tres grupos basados en la homología de sus secuencias. Grupo I TGA1 y TGA4; Grupo II TGA2, TGA5 y TGA6; Grupo III TGA3 y TGA7 (Kesarwani *et al.*, 2007). Los miembros del grupo II y grupo III se unen al elemento promotor del gen PR-1, el cual es necesario para la expresión en respuesta a AS y la interacción con NPR1. NPR1 estimula la actividad de unión al ADN de estos factores de transcripción e interactúa con TGA2 para formar un enhanceosoma AS- dependiente capaz de generar la transactivación de PR-1. Los factores TGA del grupo II tienen funciones redundantes y son esenciales para la expresión inducida de genes AS, PR y de resistencia a patógenos, mientras que TGA3 es requerido para la resistencia basal de la planta, así como una nueva forma inversa de la resistencia inducida por citoquinina contra una cepa virulenta de *P. syringae*. Los factores TGA pertenecientes al grupo I no interactúan con NPR1 en levaduras o células de plantas no infectadas debido a la presencia de dos residuos oxidados de cisteína en TGA1 y TGA4, además contribuyen a la resistencia basal contra *P. syringae* (Wang & Fobert, 2013).

Gen PR1

Los genes PR son activados durante la respuesta por SAR, son familias génicas que codifican un grupo de proteínas denominadas PR (*Pathogenesis-*

related), las cuales tienen un importante rol en la resistencia de las plantas contra patógenos, además de intervenir en la adaptación general al estrés del tipo medioambiental (Edreva, 2005). Originalmente fueron clasificados 5 grupos de proteínas PR, desde la PR-1 hasta la PR-5, en función de su movilidad electroforética. Cada grupo está conformado por algunos subtipos de proteínas que presentan características comunes entre ellas. El grupo de proteínas PR-1 es el más abundante de todos, constituyendo aproximadamente del 1 al 2% de las proteínas totales de la hoja. En 1994, se unificó la nomenclatura para las proteínas PR bajo una propuesta basada en la agrupación de estas proteínas en función de su secuencia aminoacídica, relaciones serológicas y actividad enzimática, apareciendo en esta ocasión 11 familias de proteínas (PR-1 a PR-11), reconocidas y clasificadas en tomate y tabaco (Van Loon & Van Strien, 1999; Edreva, 2005). Actualmente se reconocen 17 familias de PR descubiertas y clasificadas en diferentes especies vegetales (Van Loon, *et al.*, 2006).

Las proteínas PR1 han sido identificadas en plantas de arroz, cebada, perejil, tabaco y tomate, reportándose dos isoformas debido a su origen químico denominadas ácidas y básicas detectadas en plantas infectadas por patógenos. Se ha detectado reforzando la pared celular, lo cual sugiere que participa en la prevención de la dispersión del patógeno (Santén *et al.*, 2005).

La activación de los genes PR y el establecimiento de SAR requieren la señalización por moléculas de AS. Las concentraciones de AS en el tejido infectado y en tejido distal a la infección aumentan tras la infección por el patógeno. La aplicación exógena de AS o productos sintéticos análogos como 2,6- ácido dicloronicotínico (INA) y benzo (1,2,3)-tiadiazol ácido 7-carbotioico S-metilester. La transducción de señales de AS requiere la función de la proteína NPR1 (Nonexpressor of PR1 también conocido como NIM1) que actúa como un co-activador de transcripción de genes PR. NPR1 actúa con factores de transcripción que forman un complejo activador de genes PR, uno de eso FT es

TGA2 cuya función de unión al ADN se ve reforzada por NPR1 (Kinkema *et al.*, 2000; Maier *et al.*, 2011).

Inductores de resistencia

Las plantas tratadas con inductores o también llamados elicitores generalmente desarrollan resistencia al hospedante, por lo que la aplicación de elicitores exógenos en la superficie de la planta activa múltiples rutas de señalización de defensa intracelular (Holopainen *et al.*, 2009) que participan en múltiples sistemas de defensa e inducción de resistencia no específica a varios patógenos. Existen varios tipos de inductores bióticos o abióticos; de los bióticos destaca el uso de hongos o bacterias como elicitores o el uso de productos metabólicos o estructurales de los mismos como glucanos, iposacáridos, esfingolípidos, antibióticos, quitina, ergosterol, proteínas y péptidos, ácido salicílico y compuestos orgánicos volátiles. Otras moléculas utilizadas son los Carbohidratos como la sacarina, glucanos y quitosan; otras moléculas inductoras son DL-3-Ácido aminobutírico (BABA), lípidos y óxido nítrico (Riveros, 2010). En la tabla 2 se muestran algunas moléculas y/o sustancias sintetizadas que se utilizan como inductores de resistencia a patógenos (Gómez & Reis, 2011).

Tabla 2. Moléculas y/o sustancias inductoras de resistencia y patógenos controlados.

Sustancias inductoras	Patógenos controlados
Fosfatos de potasio, sodio o magnesio.	<i>Blumeria graminis</i> sp. <i>Hordei</i> <i>Sphaerotecafulginea</i> <i>Colletotrichumlagenarium</i> <i>Puccinia sorghi</i> <i>Exerohilum turcicum</i> <i>Leveillula taurica</i> <i>Bremia lactucae</i> <i>Peronospora parasitica</i>

Fosfitos de potasio o calcio.	<i>Pseudoperonospora</i> <i>Phytophthora</i> <i>Albugo</i> <i>Peronospora</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> <i>Colletotrichum</i>
Fosetil aluminio	<i>Botrytis</i> spp <i>Plasmopara</i> spp <i>Phytophthora</i> spp
Ácido salicílico	<i>Pantoea</i> Virus <i>Alternaria</i> <i>Septoria</i>
Acibenzolar s-metílico	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Puccinia helianthi</i>
Ácido jasmónico	<i>Pyricularia grisea</i> Varios
Etileno	Varios
Ácido β -aminobutírico (ABAB)	Hongos nematodos virus bacterias
Quitosana	<i>Alternaria padwickii</i> <i>Bipolaris oryzae</i> <i>Pyricularia grisea</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Sarocladium oryzae</i>

Probenazole	<i>Pyricularia grisea</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>
Extracto de REYSA (<i>Reynoutria sachalinensis</i>)	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>Leveillula taurica</i>
Anión superóxido y peróxido (ERO)	<i>Meloidogyne incognita</i>
Fragmentos de proteína harpina	<i>Cercospora coffeicola</i> <i>Monilinia fructicola</i> <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Bioflavonoides, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ácidos grasos y azúcares.	Varios
Silicatos de calcio, magnesio, potasio, aluminio o hierro.	<i>Cercospora coffeicola</i>
Provitamina K y derivados hidrosolubles	Hongos Bacterias

Actualmente existen una gran cantidad de moléculas que se emplean como activadoras de la inducción de resistencia sistémica en la agricultura moderna, las cuales han sido evaluadas en laboratorio, invernadero y campo y se comercializan con la leyenda de inductoras de SAR. Los nombres comerciales son **Coronalon** (6 metil-etil inonoil isoleucina), **Quitosano**, **Oryzemato** cuyo ingrediente activo es el PBZ (3 alilcil-1,2 benzisotiazol-1,1-dioxido), **Fosfanato de potasio** o **fosfito**, **Kendal**®, **Messenger**®, **Biorend**®, **Fosfimax 40-20**®, **Etefon**® (ácido 2-cloroetilfosfónico), **Actigard**®50 GS y **Rezist**® (Tomado de Salgado, 2012).

Otro tipo de inductores son aquellos provenientes de extractos vegetales como brasinólida, jasmonatos y compuestos relacionados, oligogalacturónidos, oxalatos, etileno y ácido salicílico (Riveros 2010).

Las alcanidas

Las alcanidas están constituidas por la condensación de un ácido graso de longitud de cadena de mediana a larga, que puede ser de ocho a dieciocho carbonos generalmente, alifática o lineal, y una amina proveniente de algún aminoácido por descarboxilación al momento de su condensación. Su importancia radica en la variedad de efectos, ya que su actividad depende de la estructura y el número de enlaces o ligaduras dobles que presenten. Las alcanidas naturales más ampliamente utilizadas son extraídas de las raíces de la planta de *Heliopsis longipes* que comúnmente se le conoce como chilcuague la cual es una planta endémica de la sierra gorda de Guanajuato La afinina, es la más distribuida de las alcanidas, tiene efecto bactericida, insecticida, fungicida, anestésico local, entre otras. Estudios recientes afirman que además de la afinina existen otras alcanidas que presentan actividad fungistática y bacteriostática como son las moléculas *N*-isobutil-2*E*-decanamida, *N*-(2-fenil-etil) decanamida y *N*-isobutil dodecanamida (Gómez *et al.*, SF).

Las alcanidas comprenden más de 200 compuestos relacionados y han sido encontrados en plantas de las familias: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae. Algunas plantas medicinales tradicionales producen estos metabolitos secundarios durante su ciclo de vida en respuesta a condiciones de estrés, entre otros procesos y la defensa química contra competidores o microbios y depredadores herbívoros. Varias especies del género *Echinacea* acumulan alcanidas insaturadas que van de 12 a 18 átomos de carbono en respuesta a JAs (Méndez *et al.*, 2011).

Se ha probado el potencial de las alcanidas como inductores de resistencia, obteniendo importantes logros respecto a la activación de respuestas de defensa.

La activación de las respuestas de defensa en las plantas implica el refuerzo de la pared celular, la producción de compuestos antimicrobianos y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis. Las alcanidas pertenecen a un grupo de lípidos bioactivos de plantas que regulan diferentes procesos del desarrollo vegetal. La N-isobutil decanamida es una alcanida de longitud corta en su cadena lipofílica (10 carbonos, sin insaturaciones) proveniente de la reducción catalítica de la afinina. La aplicación exógena en concentraciones micromolares de N-isobutil decanamida a cultivos *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*, causa alteraciones drásticas en el desarrollo, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria, induciendo la formación de raíces laterales y adventicias, y provocando la formación de estructuras indiferenciadas de aspecto calloso sobre las hojas, además de inducir la expresión de al menos 181 genes relacionados con respuestas de defensa y estrés y un aumento considerable en sus niveles de expresión. En particular, los genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis del ácido jasmónico (AJ). Dicha inducción se produjo en paralelo con la acumulación de AJ, óxido nítrico (ON) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en las plantas tratadas. La activación de las respuestas antes mencionadas fueron suficientes para conferir resistencia en hojas de *Arabidopsis* contra el ataque de los hongos necrotrofos *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*. Mutantes de *Arabidopsis* alteradas en las vías de señalización del AJ fueron incapaces de defenderse de manera exitosa contra el ataque de *B. cinérea* en tratamientos con la N-isobutil decanamida, lo que sugiere que las alcanidas modulan respuestas de defensa, a través del control de la biosíntesis y señalización del AJ (Méndez, 2012).

La alcanida N-linolenil-L-glutamina, ha sido identificada en las secreciones orales del gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*) y es capaz de provocar respuestas de defensa en la planta mediante la inducción de la producción de productos químicos volátiles que atraen a los depredadores y parásitos del atacante (Lait *et al.*, 2003). La producción inducida de AJ por lesión de la hoja en *Nicotiana attenuata* se amplifica mediante la aplicación de estas

secreciones orales, lo que indica una interferencia recíproca entre rutas de señalización relacionadas de JAs y Alcamidas (Halitschke *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Inducir resistencia a *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate mediante la aplicación de alcalmidas naturales.

Objetivos específicos:

- Caracterizar la expresión fenotípica de resistencia a CLso en plantas de tomate tratadas con alcalmidas naturales.
- Identificar la expresión de genes de resistencia a patógenos expresados en plantas de tomate tratadas con alcalmidas naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del experimento consistió en aplicación de alcaloides naturales como inductores de resistencia, en plantas de tomate inoculadas con la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum*, utilizando como vector adultos de *B. cockerelli*. Se caracterizó fenotípicamente la respuesta de las plantas ante la presencia de la bacteria y de las alcaloides; y se evaluó la expresión de los genes JAZ, PR1, MYC2 y TGA, relacionados con la respuesta de defensa de las plantas.

Ubicación del experimento. El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología Molecular y el invernadero de Parasitología agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Obtención de material biológico. Se estableció bajo condiciones controladas una colonia de *Bactericera cockerelli* en plantas de papa y tomate infectadas con la bacteria *C. Liberibacter solanacearum*, a temperatura de 22 °C con fotoperiodo 14:10h (L/O) (Lévy *et al.*, 2013). Para confirmar la presencia de CLso en *Bc* se realizó una extracción de ADN de los insectos, con el siguiente procedimiento: se tomaron 10 adultos y fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido al cual se le agregaron 600µl de buffer de lisis (Tris-HCL 100mM pH 8, EDTA 50mM pH 8.5, NaCl 50mM, SDS 2%) y se recuperó el macerado en un tubo ependorff de 1.5mL. Al tubo se le adicionaron 500µl de cloroformo alcohol isoamilico 24:1, se mezcló durante medio minuto en vortex y se centrifugó durante 15 min a 12 000rpm. La fase superior del centrifugado se recuperó en un tubo limpio y se le adicionó una cantidad equivalente de isopropanol frío; se dejó reposar en hielo durante 15 minutos y se centrifugó por 10 min a 12 000rpm. Se desechó la fase acuosa, la pastilla en el fondo del tubo se enjuagó dos veces con

alcohol al 70%. El ADN fue resuspendido en 50µl de agua estéril. Para la verificar la extracción, el ADN se corrió en un gel de agarosa al 2%.

La amplificación por PCR para Clso se llevó a cabo con los iniciadores Cli.PO.F (TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT) y O12c (GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT), que amplifican una región de 1 700pb. Las condiciones de la reacción fueron Buffer 1x, MgCl₂ 2.5mM, dNTP's 200µM, Cli.po.F 20pmole, O12c 20pmole, Taq 1U y 50ng de ADN, con un volumen final de 25µl. El programa de amplificación fue un ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 62°C por 30s y 72°C por 1min, con un ciclo adicional de 72°C por 10 min.

Obtención de extracto de *H. longipes*. El extracto concentrado de alcamidas se obtuvo a partir de un macerado alcohólico de raíz de *H. longipes*, el cual fue proporcionado por el Dr. Alberto Flores Olivas. El extracto se filtró al vacío con un filtro Whatman No. 1, posteriormente se concentró en un rotovapor a 78°C durante 4h a 150rpm. El concentrado de extracto fue enviado al CINVESTAV unidad Irapuato, para determinar la concentración de la alcamida afinina, mediante la técnica de HPLC.

Tratamientos. El estudio consistió en seis tratamientos con 15 repeticiones: Testigo absoluto (TA), Testigo inoculado con bacteria (SB), Plantas asperjadas con alcamidas (ScA), Plantas asperjadas con alcamidas e inoculadas con bacteria (A+B), Plantas asperjadas con producto de prueba (Px) y Plantas asperjadas con producto de prueba e inoculadas con bacteria (Px+B).

Para inocular las plantas con CLso, se colocaron 10 adultos de *Bc* portadores de la bacteria durante 24 horas, en los tratamientos SB, A+B y Px+B, utilizando pequeñas bolsas de organza. Pasadas las 24 horas, fueron retirados los adultos así como los huevecillos que depositaron en las hojas.

Se realizaron tres aplicaciones del extracto concentrado de alcanidas a una concentración de 350ppm de afinina los tratamientos ScA y A+B. La primera fue al momento del trasplante, el cual se realizó cuando las plantas presentaron de 5-6 hojas verdaderas; la segunda aplicación fue a los 30ddt y la tercera a los 60ddt. En los tratamientos Px y Px+B se aplicó un producto de prueba a dosis única al momento del trasplante.

Expresión fenotípica asociada a la inducción de resistencia. El monitoreo de los cambios fenotípicos en cada uno de los tratamientos comenzó a partir del primer mes de establecido el experimento y una vez que se confirmó la presencia de la bacteria en los tratamientos correspondientes. Las revisiones se realizaron cada mes durante cuatro meses.

A los 20 días posteriores a la infestación, se tomó una muestra de cada una de las plantas expuestas al insecto, para extraer ácidos nucleicos y determinar el porcentaje de inoculación efectiva de la bacteria.

Para la obtención del ADN mezclado de la planta y la bacteria, 100mg de la cada muestra fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido y se les agrego 1ml de buffer de extracción CETAB (Tris-HCl 100mM pH8, EDTA 20mM pH8, NaCl 1.4M, CETAB 3%, β -mercaptoetanol 0.2%), la mezcla se vació en un tubo ependorff de 1.5ml, se agito en vortex e incubo en baño maría a 55°C/30min, posteriormente se centrifugo a 16000rpm/5min. Se recuperó la fase superior en un tubo limpio y se le agrego un volumen proporcional de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), se mezcló por inversiones suaves y se centrifugo a 12000rpm/10min; La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se le agregaron 50 μ l de acetato de amonio 7.5M y 800 μ l de etanol absoluto, se incubo durante 1hora en hielo y se centrifugo a 12000rpm/5min, se desechó el sobrenadante y se enjuago la pastilla con etanol 70%, la pastilla fue disuelta en 50 μ l de agua milli-Q.

La identificación de CLso fue con los iniciadores Cli.PO.F y O12c bajo las mismas condiciones utilizadas con el vector.

Expresión de genes involucrados en la inducción de resistencia. Se tomaron las hojas de una planta, de las cuales se formó una muestra compuesta, dicha muestra fue colocada en una bolsa de papel encerado y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Tomando tres repeticiones por tratamiento a las 12h, 24h, 48h, 72h y 96h, posteriores a cada una de las aplicaciones del concentrado de afinina y el producto comercial. La muestra se almaceno a -70°C hasta su procesamiento.

La extracción de ARN se realizó con el kit de extracción para ARN de la marca Axigen y la reacción RT-PCR con el kit SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de la marca Axigen (ANEXO 1).

Los genes objetivo fueron: PR1, TGA, JAZ Y MYC2 para los cuales se diseñaron iniciadores específicos con el software *Primer 3* sobre la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (ANEXO 2) obteniendo las siguientes secuencias: LP-P7 (5' TACTCAGGTGGTGTGGCGTA '3) y RP-P8 (5' TCAAAGCCGGTTGATTTTC '3), LP-G5 (5' TTCAGGCAAACAGCTTGATG '3) y RP-G6 (5' GAGAACGAGCTCGCTGAAGT '3), LP-J1 (5' CGTCCGTTGAAACAAATCCT '3) y RP-J2 (5'GGGGTTCTGTTTGTGGCTA'3), LP-M3 (5' CGACGACAACGCTTCTATGA '3) y RP-M4 (5' CCAACCTTCGTGTGTTTCCTT '3) respectivamente.

RESULTADOS

Se logró identificar la presencia de CLso en los insectos de la colonia establecida, de la cual se tomaron los insectos para la inoculación de las plantas (Figura 1).

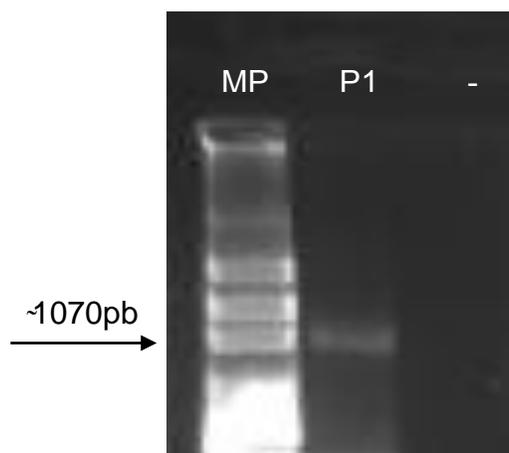


Figura 1. Resultados positivos a la presencia de CLso en insectos, banda amplificada de 1070pb, utilizando un marcador de peso molecular de 100-3000pb. P1 insectos portadores de bacteria tomados de la colonia establecida.

La cuantificación de alcaloides mediante HPLC se dirigió a la cuantificación de afinina presente en el extracto, la cual registró un tiempo de retención de 23 minutos, tiempo correspondiente a la alcaloide afinina (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000), obteniendo una concentración de 70 800ppm. El extracto fue almacenado en oscuridad a 4°C.

De las 45 plantas expuestas a los insectos, se determinó que 35 de estas fueron inoculadas con la bacteria (Figura 2), arrojando un 77.7% en la eficiencia de la transmisión (ANEXO 3), porcentaje del cual los tratamientos Px+B y A+B presentaron un 80% de incidencia y SB un 73.3%. En el resto de los tratamientos

no se identificó la presencia de la bacteria ni de los síntomas asociados a la presencia de ésta.

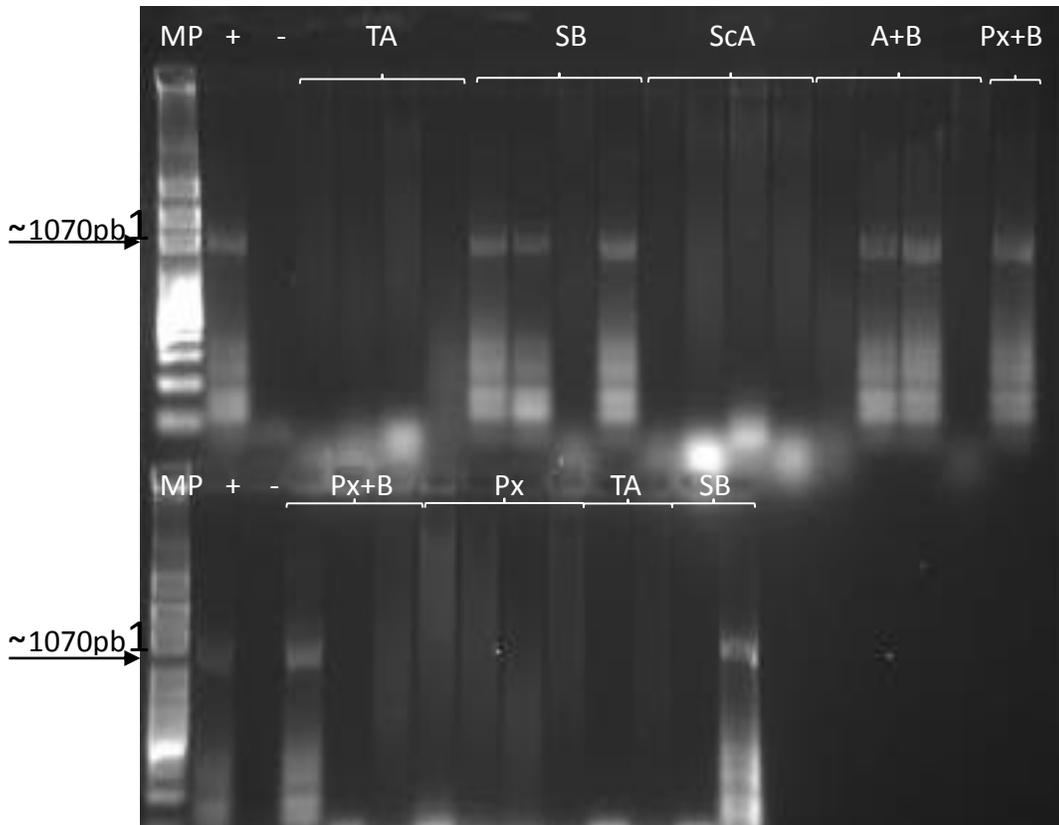


Figura 2. Identificación de CLso en cada uno de los tratamientos.

Cambios fenotípicos y análisis de la severidad de la enfermedad

El monitoreo periódico de la evolución de los síntomas en las plantas inoculadas (tabla 3), reveló que los primeros síntomas correspondientes a PT comenzaron a manifestarse entre los 25 y 30 días posteriores a la infección, comenzando con leves enroscamientos en las hojas más jóvenes de la planta, las cuales a lo paso del tiempo comienzan a presentar un tono clorótico en los bordes y en las puntas, al mismo tiempo que el follaje del resto de la planta se torna de un verde más intenso que el de las plantas sanas y una consistencia quebradiza. En seguida el resto de las hojas comienzan a mostrar enroscamiento

y clorosis en los bordes, en este punto el ápice muestra severas deformaciones lo cual provoca que el crecimiento de la planta sea más lento o que se detenga por completo. Algunas de las plantas producen botones florales, los cuales comienzan a secarse de las puntas hacia el pedúnculo mostrando cierta ligadura en la cercanía al tallo, aquellas plantas que lograron el amarre de frutos, estos fueron muy pequeños o abortados posteriormente. Las nervaduras de las hojas que inicialmente mostraron clorosis se tornan de color púrpura, cambio que comienza en las puntas de las hojas y que poco a poco se va presentando en toda la planta hasta cubrirla en más de un 80%, en algunas plantas la coloración de las nervaduras se presentó aunque en las hojas no se haya observado clorosis. Posterior a esto las hojas con mayor superficie púrpura comienzan a secarse en forma similar a los botones florales, comenzando de las puntas hacia el peciolo en forma de "V", la apariencia de las hojas es seca pero con consistencia flexible hasta volverse quebradiza. En este punto la planta ya no representa ningún valor comercial al no presentar frutos o tenerlos pero muy pequeños. El secado de las hojas siguió avanzando hasta consumir completamente el follaje y el tallo principal de la planta, por lo cual se declaró muerta. Otros síntomas que se presentaron solo en algunas plantas del tratamiento inoculado con la bacteria y asperjado con alcamidas (A+B) fue la generación de entrenudos alargados en las plantas que presentaron un desarrollo relativamente normal. Otro síntoma observado fue la producción excesiva de yemas axilares con bifurcación inmediata sobre el tallo y sobre el raquis de las hojas en los tratamientos con bacteria más alcamidas (A+B) y producto de prueba más bacteria (Px+B), cambio que no se puede asociar con certeza a la presencia de la bacteria por no presentarse en el testigo inoculado (SB) o a la inducción de resistencia por la aplicación de los elicitores debido a que no se presentó de forma uniforme en todas las repeticiones de cada tratamiento.

En los tratamientos establecidos, las primeras plantas en mostrar síntomas fueron las de los tratamientos del testigo inoculado (SB) y producto de prueba más bacteria (Px+B) a los 30dt, enseguida a los 45 días los síntomas ya se

podían observar en las plantas asperjadas con alcalidas, observándose un retraso considerable en la aparición de estos. El primer tratamiento en mostrar plantas muertas fue en el producto de prueba más bacteria (Px+B).

Tabla 3. Cambios presentes en cada tratamiento de acuerdo a la evolución de la sintomatología asociada a la presencia de la bacteria.

Tratamiento	30ddt	45ddt	60ddt	90ddt	120ddt
TA	Pss	Pss	Pss	Pss	Pss
ScA	Pss	Pss	Pss	Pss	Pss
SB	EA, CA	EG+CG, VI, HQ, AF	DA, RC, NP	SY, PM,	FP, PE, DG
Px	Pss	Pss	Pss	Pss	*Pss
A+B	Pss	EA, CA	EG+CG, VI, HQ	AF, DA, RC, NP, **EnA, SY	FP, PM, DG, PE
Px+B	EA	EG, CA	EG+CG, VI, HQ, AF	DA, RC, NP, PM, DG	PI

Pss.- Planta con desarrollo normal; EA.- Enroscamiento de hojas apicales; EG.- Enroscamiento general de la planta; CA.- Clorosis en los bordes de las hojas de la parte superior de la planta y el ápice; EG+CG.- Enroscamiento general y clorosis en los bordes de las hojas de toda la planta; VI.- Coloración verde más intensa; HQ.- Hojas quebradizas; DA.-Deformación del ápice; RC.- Retraso del crecimiento; EnA.- Entrenudos alargados; NP.- Nervaduras con coloraciones purpuras; AF.- Aborto de botones florales; PM.- Puntas moradas; SY.- Sobreproducción de yemas axilares; FP.- Foliolos con más del 50% de superficie color purpura; PE.- Producción de frutos de baja calidad; DG.- Decaimiento general; PI.- Planta muerta. *Algunas plantas de este tratamiento presentaron síntomas de deficiencias nutricionales. **Solo se observó en plantas de este tratamiento.

En base a los cambios fenotípicos registrados, al presentarse la primera planta muerta que fue a los cuatro meses de establecido el experimento, se realizó una evaluación de la severidad de los daños relacionados con la presencia de la bacteria para lo cual se propuso la siguiente escala de carácter acumulativo (Figura 3).

- 0.- Planta aparentemente sana.
- 1.- Enroscamiento de las hojas de la parte superior.
- 2.- Enroscamiento y clorosis en el borde de las hojas de la parte superior.
- 3.- Enroscamiento y clorosis en el borde las hojas de toda la planta.
- 4.- La planta se torna de un verde más intenso y presenta aborto de botones florales.
- 5.- Deformación del ápice y retraso en el crecimiento de la planta.
- 6.- Nervaduras y puntas color purpura en las hojas más jóvenes.
- 7.- Coloraciones purpura en más del 50% de las hojas superiores.
- 8.- Plantas pequeñas con enroscamiento y clorosis general, con aborto floral y puntas purpuras.
- 9.- Los folíolos del estrato superior de la planta comienzan a tornarse secas y flexibles de la punta hacia el peciolo de hoja, provocando la muerte descendente de la planta.
- 10.- Planta muerta.

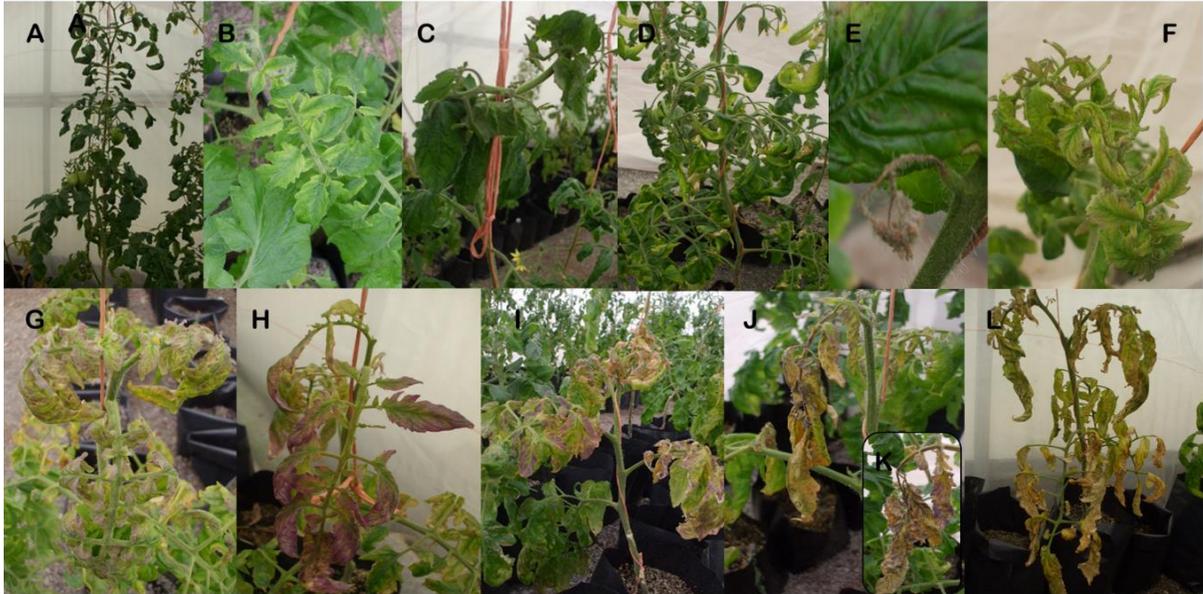


Figura 3.- Escala propuesta de acuerdo a la sintomatología expresada por la infección de la bacteria. A) nivel 0; B) nivel 1; C) nivel 2; D) nivel 3; E) nivel 4; F) nivel 5; G) nivel 6; H) nivel 7; I) nivel 8; J y K) nivel 9 y L) nivel 10.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico en relación al porcentaje de plantas que resultaron positivas, el nivel de daño que presentaron de acuerdo a la escala propuesta y el número de plantas en cada nivel, cabe mencionar que en la repetición IV del tratamiento SB no se identificó la presencia de la bacteria posiblemente por la ausencia de esta en la porción del tejido que se tomó para el análisis, pero presentó sintomatología similar al resto de las repeticiones que resultaron positivas, por lo cual se le incluyó en el análisis (ANEXO 4). Se realizó un análisis de distribución normal mediante la prueba t estudent $p=0.05$ en el programa SAS 9.0 (ANEXO 5). No se registró diferencia significativa entre las medias de cada tratamiento, presentando el valor más alto Px+B (4.2), seguido de A+B (3.5) y SB (2.21) (Figura 4). En Px+B el mayor número de plantas con síntomas se ubicaron en el nivel 3 de la escala con cuatro plantas, dos plantas

en el nivel 6, en el resto de los niveles solo se ubicó una planta a excepción de los niveles 2 y 5 donde no se hubo plantas. El tratamiento A+B presento tres plantas en los niveles 0, 1 y 6; 2 plantas en el nivel 3 y solo 1 planta en los niveles 2,7,8,9, en el resto de los niveles no se ubicaron plantas. En SB el mayor número de plantas no presentaron síntomas ubicándose 7 plantas en el nivel 0, 3 plantas en el nivel 3 y 1 planta en los niveles 2, 5, 6 y 9, y 0 en el resto de los niveles. El único tratamiento donde se registraron plantas con el mayor nivel de daño fue Px+B con un representante en el nivel 10, además de tener plantas en casi todos los niveles de la escala, seguido por A+B y SB.

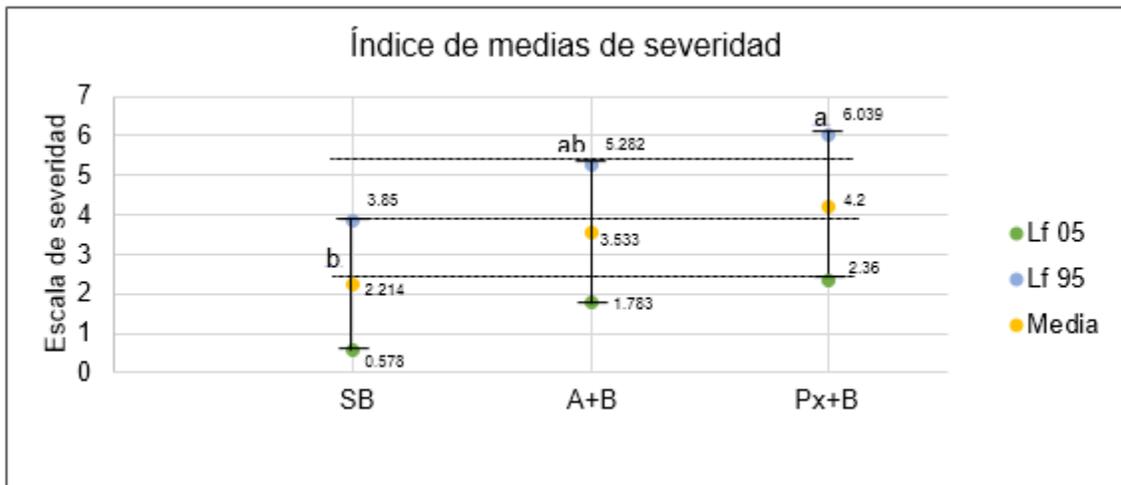


Figura 4. Comparación de medias de la severidad de los daños causados por CLso en los tratamientos inoculados. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (T estudent, p=0.05, SAS 9.0).

Expresión genética

Se obtuvo la amplificación de dos de los genes objetivo, el gen JAZ y el gen PR1 (Figura 5 y 6 respectivamente). El gen JAZ amplifico con una temperatura media de alineación de 57.6°C en los tratamientos X+B a las 48h, 72h y 96h; SB a las 24h y 72h; Px a las 72h; A+B a las 12h y 72h y un testigo (TA) a las 12h.

El gen PR1 amplifico con una temperatura media de alineación de 58.5°C en los tratamientos X+B a las 48h y 72h; Px a las 72h; SB y A+B a las 72h.

Los genes MYC2 y TGA no se identificaron en ninguno de los tratamientos tras probar diversas temperaturas de alineación.

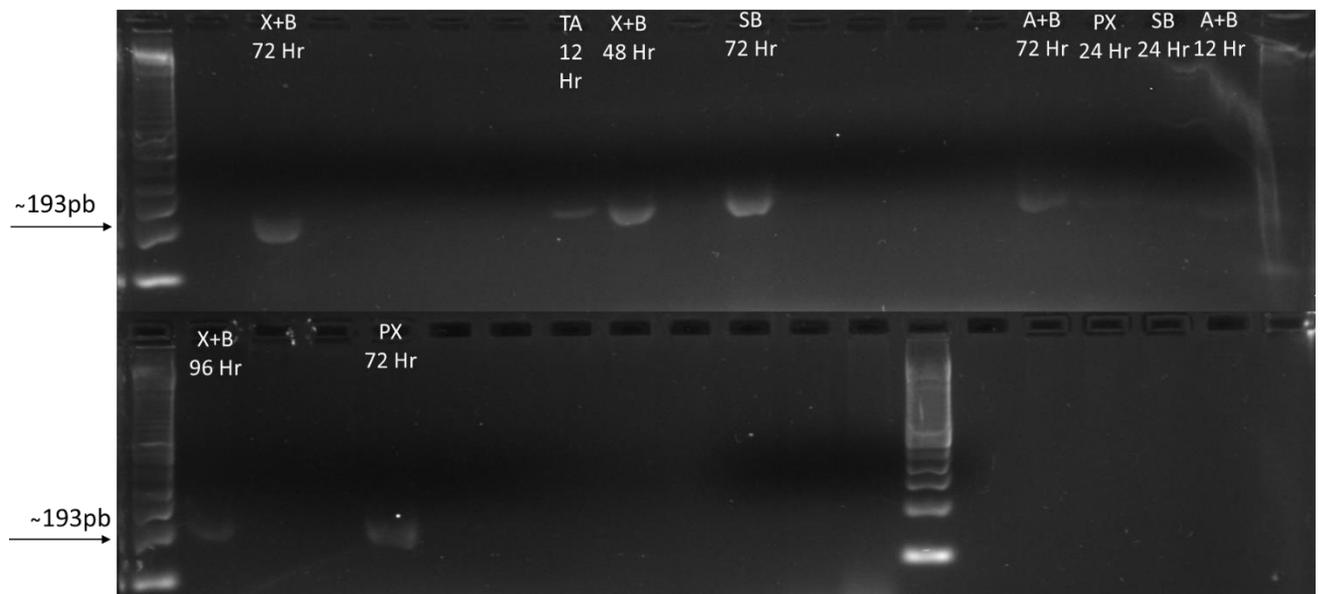


Figura 5. Productos de amplificación de RT-PCR para el gen JAZ.

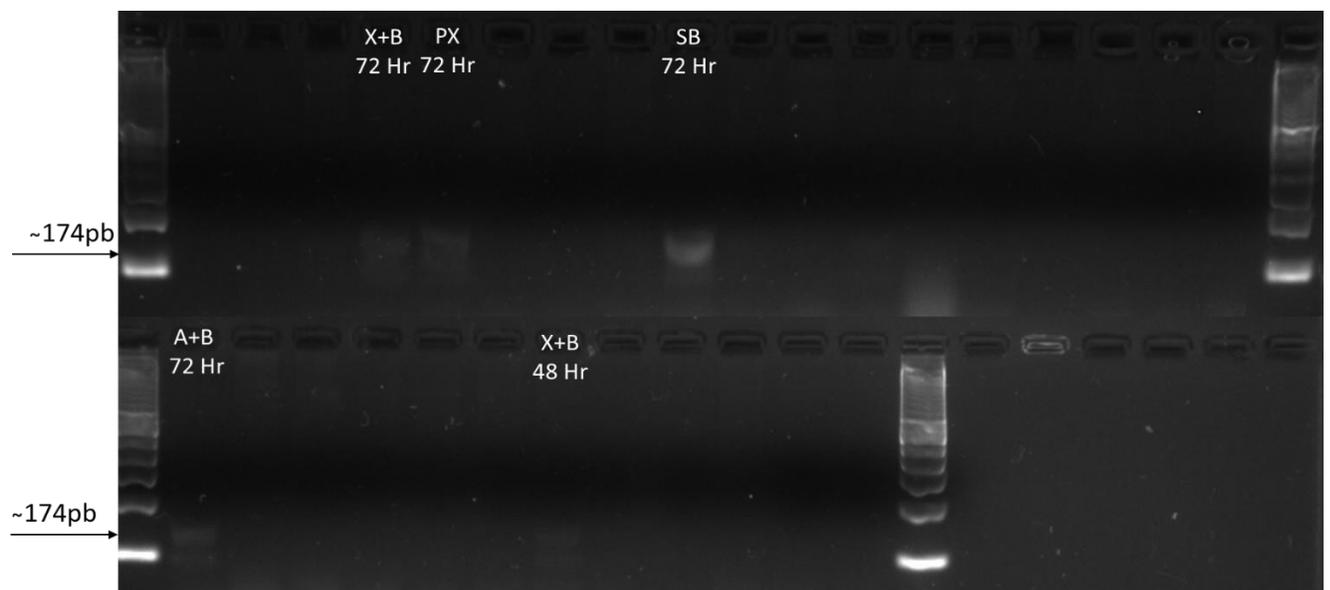


Figura 6. Productos de amplificación de RT-PCR para el gen PR1.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se obtuvo una eficiencia en la transmisión de la bacteria CLso por adultos de *Bc.* del 70.7%, lo cual coincide con lo reportado por Casteel, (2012) quien indica que la eficiencia de transmisión de los adultos de *Bc.* es del 78%.

No existe una referencia consistente respecto a la sintomatología que genera CLso en tomate, Garzón, (1984; 1986) y Munyaneza *et al.*, (2009a) indican que los síntomas son clorosis de los brotes apicales, hojas inferiores enrolladas con apariencia de “taco” y textura quebradiza, flores con necrosis y son abortadas y plantas pequeñas de un color verde más intenso que las normales además de indicar que los síntomas son similares a los que se presentan en papa. Estos síntomas concuerdan con los observados en este experimento. El resto de los síntomas encontrados y la explicación de la evolución de la enfermedad presentan un panorama más amplio de cómo es que se desarrolla la enfermedad PT y como la aplicación de inductores modifica la expresión de los síntomas.

El retraso en la aparición de los síntomas en los tratamientos asperjados con alcamidas y el no presentar deficiencias de nutrientes en las plantas de estos tratamientos se relaciona con lo indicado por Flores, (2013) quien reporto la remisión de síntomas en tomate ante la presencia de Clso y la reducción de síntomas del manchado de tubérculo en papa por la aplicación de alcamidas, respuesta que atribuyo a la inducción de resistencia sistémica y que puede estar relacionados con la capacidad de las alcamidas para actuar como hormonas de crecimiento mejorando las características agronómicas de los cultivos (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000; 2004). Estadísticamente los tratamientos inóculados con CLso no presentaron respuesta significativa respecto a la generación de

resistencia en la planta, presentado un considerable aumento en la severidad de los daños en los tratamientos que fueron tratados con el producto inductor y las alcanidas, frecuentemente se ha sugerido que para las plantas es demasiado costosa la activación de sistemas de defensa. Plantas mutantes que expresan genes PR, acumulan AS y son resistentes a patógenos, tienden a reducir su tamaño, presentan pérdida de dominancia apical, se presenta rizado de las plantas y una considerable disminución en la fertilidad. La sobre producción de la proteína NPR1 en SAR causa lesiones y clorosis bajo ciertas condiciones (Durrant y Dong, 2004), por lo que puede considerarse que la combinación de las defensas activadas en la planta por la presencia de la bacteria más las activadas por la aplicación de los inductores favoreció el desarrollo y el aumento en la severidad de los síntomas, debido a lo cual en el tratamiento SB el número de plantas sintomáticas fue menor que en el resto de los tratamientos inoculados y al igual que la severidad de los daños.

La sintomatología caracterizada como perteneciente a la enfermedad causada por CLso es válida debido a que solo se registró en los tratamientos inoculados (SB, A+B y Px+B), el resto de los tratamientos no presentaron cambios similares y tuvieron un desarrollo fenotípicamente normal, a excepción algunas de las plantas pertenecientes al tratamiento Px que al término del experimento comenzaron a expresar ciertos cambios de coloración, los cuales fueron asociados a deficiencias nutricionales.

Las alcanidas han demostrado conferir resistencia a patógenos como *Botrytis cinérea* activando la ruta de señalización y la biosíntesis de ácido jasmónico (Méndez *et al.*, 2011). Uno de los genes que participa esta ruta es el gen JAZ, que actúa como represor de esta vía (Kazan & Manners, 2012), al estar expresando en los tratamientos Px+B, Px, A+B, podemos atribuir que el tipo de resistencia que se está generando corresponde a SAR y no a la dependiente de ácido jasmónico. La expresión JAZ en el tratamiento SB indica que la bacteria es capaz de activar SAR en la planta. Esto se confirma tras la

identificación de la expresión de PR1, en los mismos tratamientos, dicha respuesta está relacionada con la expresión de SAR (Edreva, 2005).

CONCLUSIONES

Se obtuvo un porcentaje de inoculación efectiva de la bacteria del 70.7% y se caracterizó fenotípicamente la sintomatología asociada a la enfermedad causada por *Candidatus liberibacter solanacearum* y a la aplicación de alcaloides naturales como inductores de resistencia en tomate. El tipo de resistencia inducida se asoció a SAR debido a la expresión de los genes *JAZ* y *PR1*, que participan en la ruta de la biosíntesis de ácido salicílico.

LITERATURA CITADA

- Adam M, Heuer H, Hallmann J, 2014. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. PLoS One. 9 (2):e90402.
- Bayer de México (2005). La paratrioza o pulgón saltador del tomate y la papa. Boletín técnico, Bayer Crop Science. 24p.
- Bové JM (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7–37.
- Bujanos MR, Garzón JA, Marín A (2005). Manejo integrado del pulgón saltador *Bactericera(=Paratrioza) cockerelli* (Sulc) (Hemiptera:Triozidae) en los cultivos de solanáceas en México. Pp. 93-99, Memorias, Segunda convención mundial del chile. Zacatecas, México.
- Butler CD, Byrne FR, Keremane ML, Lee RF, Trumble JT (2011a). Effects of insecticides on behavior of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) and transmission of *Candidatus Liberibacter psyllauros*. Journal of Economic Entomology 104: 586–594.
- CABI. (2012). Crop Protection Compendium International. Consultado 03 de diciembre de 2013: <http://www.cabi.org/cpc/>.
- Casteel CL, Hansen AK, Walling LL, Paine TD (2012). Manipulation of Plant Defense Responses by the Tomato Psyllid (*Bactericera cockerelli*) and Its Associated Endosymbiont *Candidatus Liberibacter Psyllauros*. PLoS ONE 7(4): e35191. doi:10.1371/journal.pone.0035191

- Collazo CC, Pantoja ML, Llauger RR (2008). Técnicas empleadas para el diagnóstico del huanglongbing de los cítricos. *Revista CitriFrut*, Vol. 25, No. 2.
- Compere H (1943). A new species of *Metaphycus* parasite on psilids. *Pan-Pac. Entomol.* 19: 71-73.
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B, 2002. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7, 210–216.
- Cranshaw WS (2007). Potato or tomato psyllids. *Insects Series Home & Garden.* No. 5: 540.
- Crosslin JM, Munyaneza JE (2009). Evidence that the zebra chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and in vitro. *American Journal of Potato Research* 86: 183–187.
- Curtis LS, Tantravahi P, y Mirkov TE (2010). An evaluation of plant-derived antimicrobial and anti-insect genes on reducing zebra chip disease in transgenic potato, pp. 110–114. In *Proceedings of the 10th Annual Zebra Chip Reporting Session*, ed. F. Workneh, and C.M. Rush. Dallas, TX (November 7–10, 2010).
- Custers J. H. H. V. 2007. General introduction: Plant defense mechanisms and the use of the hypersensitive response to engineer broad-spectrum disease resistance. En: *Engineering disease resistance in plants*: 7-49.
- Demianski A. J, Mi Chung K, Kunkel B. N, 2012. Analysis of *Arabidopsis* JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 13, 46–57.
- Dempsey D. A, Klessig D. F, 2012. SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.*; 17(9):538-45.

- DGSV-CNRF (2011). *Candidatus Liberibacter solanacearum* Liefting *et al.*, 2009. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. (DGSV-CNRF) Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. México, D.F. 10 pp.
- Durrant W. E, Dong X, 2004. Systemic Acquired Resistanse. Annual Review Phytopathology 42:185-209.
- Edreva A, 2005. Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years, *Gen. Appl. Plant Physiology*, Vol 31, pg. 105-124.
- Ellis C, Karafyllidis L, Turner J. G, 2002. Constitutive activation of jasmonate signaling in *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracerum*, *Pseudomonas syringae* and *Myzus persicae*. Molecular Plant-Microbe interactions 15:1025-1030.
- Flores OA. (2013). Etiología, Detección Molecular y Manejo Integrado del Síndrome de la Punta Morada de da Papa en México. XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 31 (Suplemento).
- Fonseca S, Chico J. M, Solano R, 2009. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 539-47.
- Gao J, Bové JM (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*173: 697-703.
- Garnier M, Gao SJ, He YL, Villechanoux S, Gander J, Bové JM (1991). Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies; serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO. En: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists: B.H. Brlansky, R.F.Lee y Timmer, L.W., eds., University of Florida, Gainesville: 428-435.

- Garzón TJA (1984). Enfermedad del “permanente” del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Gto. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, SLP. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 138.
- Garzón TJA, Garza CA, Bujanos MR (1986). Determinación del insecto vector de la enfermedad de tipo viral “permanente del tomate” (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la región del Bajío, In: XIII Congreso Nacional de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chis. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 30.
- Gharalari AH, Nansen C, Lawson DS, Gilley J, Munyaneza JE, Vaughn K (2009). Knockdown mortality, repellency, and residual effects of insecticides for control of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 102: 1032–1038.
- Gómez D. E, Reis E. M, 2011. Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química viva* No. 1. Año 10.
- Gómez M. F. J, Ramirez C. E, Molina T. J, SF. Síntesis enzimática de alcaloides en medio no acuoso y evaluación de su actividad biológica. V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular.
- Gudmestad NC, Secor GA (2007). Zebra Chip: A new disease of potato. *Nebr Potato Eyes* 19:1-4.
- Halitschke R, Schittko U, Pohnert G, Boland W, Baldwin I. T, 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivorespecific plant responses. *Plant Physiol* 125: 711–7.

- Hammerschmidt R, Nicholson RL, 1999. A survey of plant defense responses to pathogens. In: Agrawal A, Tuzun S, eds. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. St Paul, MN: APS Press, 55–71.
- Hasegawa S, Sogabe Y, Asano T, Nakagawa T, Nakamura H, Kodama H, Ohta H, Yamaguchi K, Mueller M. J, Nishiuchi T, (2011). Gene expression analysis of wounding-induced root-to-shoot communication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 34, 705–716.
- Hernández DMG (2013). Etiología del variegado del Chile (*Capsicum annum* L.) en Yurécuaro, Michoacán. Colegio de postgraduados, Campus Montecillos. Tesis de maestría.
- Holguín RL, Vázquez JRC y Martínez SJP. (2007). First Report of a 16Srl-B Group Phytoplasma Associated with a Yellow-Type Disease Affecting Tomato Plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Dis.* 91:328
http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Liberibacter_psyllaurous.htm. Fecha de consulta marzo 2014.
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1994). The Phloem Limited Bacterium of greening disease of citrus is a Member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 44:379-386.
- Kazan K, Manners J. M, 2012. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science*, Vol. 17, No. 1.
- Kazan K, Manners J. M, 2013. MYC2: the master in action. *Molecular Plant* Vol.6. Num. 3, p 686-703.
- Kesarwani M, Yoo J, Dong X, 2007. Genetic Interactions of TGA Transcription Factors in the Regulation of Pathogenesis-Related Genes and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol. 144, pp. 336–346.

- Khairulmazmi A, Kamaruzaman S, Habibuddin H, Jugah K, Syed O (2008). Occurrence and spread of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of Huanglongbing disease of citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4: 103- 111.
- Kinkema M, Fan W, Dong X, 2000. Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of *PR* Gene Expression. *The Plant Cell*, Vol. 12, 2339–2350.
- Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF). 2013. Ficha técnica, Zebra chip- *Candidatus Liberibacter solanacearum*. SENASICA.
- Lacey LA, de la Rosa F, Horton DR (2009). Insecticidal activity of entomopathogenic fungi (Hypocreales) for potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae): Development of bioassay techniques, effect of fungal species and stage of the psyllid, *Biocontrol Science and Technology*, 19: 9, 957-970.
- Lacey LA, Liu TX, Buchman JL, Munyaneza JE, Goolsby JA, Horton DR (2010). Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. *Biological Control* 56 (2011) 271-278.
- Lait C. G, Alborn H. T, Teal P. E. A, Tumlinson J. H, 2003. Rapid biosynthesis of N-linolenoyl-L-glutamine, an elicitor of plant volatiles, by membrane-associated enzyme(s) in *Manduca sexta*. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(12): 7027–7032.
- Li W, Abad JA, French MRD, Rascoe JA, Wen A, Gudmestad NC, Secor GA, Lee IM, Duan Y, Levy L (2009). Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in potato plants with zebra chip. *Phytopathology*.78:59-65

- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS, Clover GRG (2009a). A new „*Candidatus Liberibacter*” species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 93:208-214.
- Lin H, Lou B, Glynn JM, Doddapaneni H, Civerolo EL, Chen C, Duan Y, Zhou L, Vahling CM (2010). The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. Submitted (09-DEC-2010) National Center for Biotechnology Information, NIH, and Bethesda, MD 20894, USA. Online Only.
- Liu D, Trumble JT (2004). Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 97:1078-1085.
- Maier F, Zwicker S, Hüchelhoven A, Meissner M, Funk J, Pfitzner AJ, Pfitzner UM. 2011. NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Mol Plant Pathol.* 12(1):73-91.
- Méndez B. A, 2012. Efecto de la alcalamida N-isobutil decanamida en la expresión global de genes de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Méndez B. A, Calderón V. C, Ibarra L. E, Raya G. J, Ramírez C. E, *et al.*, 2011. Alkamides Activate Jasmonic Acid Biosynthesis and Signaling Pathways and Confer Resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 6(11): e27251.
- Munyaneza E. J., Sengoda G.V., Buchman L.J. y Fisher W.T. 2011. Effects of temperature on “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” and Zebra Chip Potato Disease Symptom Development. *Plant Disease.* 10.1094/PDIS-03-11-0185.

- Munyaneza JE, Buchman JL, Sengoda VG, Fisher TW, Pearson CC (2011). Susceptibility of Selected Potato Varieties to Zebra Chip Potato Disease. *Am. J. Pot Res* 88:435–440.
- Munyaneza JE, Crosslin JM, Upton JE (2007a). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: *Psyllidae*) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100: 656–663.
- Munyaneza JE, Fisher WJ, Sengoda GV, Garczynski F (2010). First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” associated with psyllid affected carrots in Europe. *Plant Disease* 94: 639.
- Munyaneza JE, Sengoda VG, Garzón TJA, Cárdenas VOG (2009a). First Report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in tomato plants in Mexico. *Plant Disease*, 93:10:1076.
- Munyaneza JE, Sengoda VG, Garzón TJA, Cárdenas VOG. (2009b). First Report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in pepper plants in Mexico. *Plant Disease*, 93:10:1076.
- Murray RGE, Schleifer KH (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:174.
- Murray RGE, Stackebrandt E (1995). Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described Procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:186-187.
- Nelson WR., Sengoda VG., Alfaro-Fernandez AO., Font M. I., Crosslin J. M., y Munyaneza J. E. (2013). A new haplotype of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” identified in the Mediterranean region. *Eur J PlantPathol.*135:633 - 639.
- Pavlista AD (2002). Potato (tomato) psyllids. *Nebraska Potato Eyes* 14: 1-4.

- Peng L, Trumble JT, Munyaneza JE, Liu TX (2011). Repellency of a kaolin particle film to potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), on tomato under laboratory and field conditions. *Pest Management Science* 67: 815–824.
- Pletsch D.j., 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. *Montana Agric. Exp. St. Bull.* 446: 1-95.
- Ravindran A, Levy J, Pierson E, Gross DC (2011). Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Plant Dis.* 95:1542-1546.
- Riveros A. A. S, 2010. Inducción de resistencia en plantas. Interacción planta: patógeno. San José, C. R. IICA. p. 261.
- Roy A. and Brlansky, R. H. (2009). Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology* 99:1297-1306.
- Salgado S. M. L, 2012. Inductores de resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados.
- Schneider H (1968). Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathology* 58: 1155-1160.
- Secor GA, Rivera VV (2004). Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Rev. Latinoamericana Papa (Suppl.)* 1:1-8.
- Secor GA, Rivera VV, Abad IM, Lee GRG, Clover LW, Liefting X, Li, De Boer SH (2009). Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93: 574–583.

- SIAP. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx (Fecha de consulta mayo 2014).
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF) (2012). Ficha técnica zebra chip *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México, DF. 24p.
- Tanaka FAO, Colleta FHD, Alves KCS, Spinelli MO, Machado MA, Kitajima EW (2007). Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatol. Bras.* 36, 519–520.
- Texeira CD, Saillard C, Eveillard S, Danet LJ, Da Costa P, Ayres JA, Bové J (2005). “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1857–1862.
- Truman W, Bennett M. H, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M, (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 104, 1075–1080.
- Van Loon L, Rep M, Pieterse C, 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol 44, pg: 135-162.
- Van Loon L, Van Strien E, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 55, pg: 85-97.
- Vander Ent S, Van Hulten M, Pozo M. J, Czechowski T, Udvardi M.K, Pieterse C. M. J, *et al.* (2009). Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *NewPhytol.* 183, 419–431. doi:10.1111/j.1469-8137.02851.x.

- Villechanoux S, Garnier M, Bové JM (1990). Purification of the bacterium-like organism associated with greening disease of citrus by immunoaffinity chromatography and monoclonal antibodies. *Curr.Microbiol.* 21: 175-180.
- Vlot A. C, Dempsey D. A, Klessing D. F, 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Walters D, Newton A, Lyon G. D, 2007. *Induced Resistance for Plant Defence, A Sustainable Approach to Crop Protection.* Blackwell Publishing. 1st. ed.
- Wang L, Fobert P. R, 2013. *Arabidopsis* Clade I TGA Factors Regulate Apoplastic Defences against the Bacterial Pathogen *Pseudomonassyringae* through Endoplasmic Reticulum-Based.
- Yang XB, Zhang YM, Hua L, Peng LN, Munyaneza JE, Liu TX (2010). Repellency of selected biorational insecticides to potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Crop Protection* 29: 1329–1324.

ANEXOS

ANEXO 1. Diseño de iniciadores específicos en el programa *Primer 3*.

GEN JAZ (*Arabidopsis thaliana*). NCBI ID: 838310

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	558	20	60.01	45.00	6.00	3.00	ttccctccatcgattcttg
RIGHT PRIMER	750	20	60.02	40.00	7.00	0.00	tttgatatgggccatggtt

SEQUENCE SIZE: 825

INCLUDED REGION SIZE: 825

PRODUCT SIZE: 193

GEN MYC2 (*Arabidopsis thaliana*). NCBI ID: 840158

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	45	20	60.01	50.00	3.00	2.00	cgacgacaacgcttctatga
RIGHT PRIMER	249	20	60.01	50.00	3.00	0.00	ccaaccttcgtgttcctt

SEQUENCE SIZE: 1872

INCLUDED REGION SIZE: 1872

PRODUCT SIZE: 205

GEN TGA (*Arabidopsis thaliana*). NCBI ID: 837353

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	138	20	59.99	45.00	5.00	3.00	ttcaggcaaacagcttgatg
RIGHT PRIMER	298	20	59.90	55.00	8.00	1.00	gagaacgagctcgctgaagt

SEQUENCE SIZE: 1074

INCLUDED REGION SIZE: 1074

PRODUCT SIZE: 161

GEN PR1 (*Arabidopsis thaliana*). NCBI ID: 815949.

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 62 20 60.07 45.00 4.00 0.00 **ttcttcctcgaaagctcaa**

RIGHT PRIMER 235 20 59.99 55.00 4.00 1.00 **aaggcccaccagagtgtatg**

SEQUENCE SIZE: 486

INCLUDED REGION SIZE: 486

PRODUCT SIZE: 174

ANEXO 2. Protocolo RT-PCR con SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de INVITROGEN®

1. Programar el termociclador de modo que la síntesis de cDNA sea seguida inmediatamente de la amplificación por PCR.

A: Síntesis de cDNA y pre-desnaturalización	B: amplificación por PCR	C: Extensión Final (opcional)
1 ciclo de: 45–55°C por 15–30 min 94°C por 2 min	Programar 35–40 ciclos: Desnaturalización, 94°C por 15 seg Anillamiento, 55–60°C por 30 seg Extensión, 68–72°C por 1 min/kb	1 ciclo de: 72°C por 5–10 min

2. Condiciones de la reacción

Componente	Vol/50 µL	Concentración final
2X Reaction Mix	25 µL	1X
RNA	x µL	10 pg–1 µg
Sense Primer (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Anti-sense Primer (10 µM)	1 µL	0.2 µM
RT/ Platinum® Taq Mix	1 µL	—
Autoclaved distilled wáter	to 50 µL	—

3. Mezclar perfectamente los componentes de la reacción y colocar en termociclador.
4. Analizar los productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

ANEXO 3. Resultados obtenidos de la incidencia en cada una de las repeticiones de los tratamientos inoculados y nivel de severidad de acuerdo a la escala propuesta.

Tratamiento	Repetición	Incidencia	Severidad
SB	REP1	-	0
SB	REP2	+	2
SB	REP3	+	0
SB	REP4	-	6
SB	REP5	-	0
SB	REP6	+	3
SB	REP7	+	0
SB	REP8	+	3
SB	REP9	+	9
SB	REP10	+	3
SB	REP11	+	0
SB	REP12	+	5
SB	REP13	+	0
SB	REP14	-	0
SB	REP15	+	9
A+B	REP1	+	1
A+B	REP2	+	6
A+B	REP3	+	2
A+B	REP4	-	0
A+B	REP5	+	3
A+B	REP6	-	0
A+B	REP7	+	1
A+B	REP8	+	9
A+B	REP9	-	0
A+B	REP10	+	1
A+B	REP11	+	8

A+B	REP12	+	6
A+B	REP13	+	7
A+B	REP14	+	6
A+B	REP15	+	3
Px+B	REP1	+	6
Px+B	REP2	+	7
Px+B	REP3	-	0
Px+B	REP4	+	3
Px+B	REP5	-	0
Px+B	REP6	-	0
Px+B	REP7	+	9
Px+B	REP8	+	3
Px+B	REP9	+	4
Px+B	REP10	+	3
Px+B	REP11	+	1
Px+B	REP12	+	6
Px+B	REP13	+	8
Px+B	REP14	+	10
Px+B	REP15	+	3

ANEXO 4. Índice de la enfermedad en cada tratamiento

Tratamiento	Escala	No de plantas	Índice de la enfermedad
SB	0	7	0
	1	0	0
	2	1	0.13333333
	3	3	0.6
	4	0	0
	5	1	0.33333333
	6	1	0.4
	7	0	0
	8	0	0
	9	1	0.6
A+B	10	0	0
	0	3	0
	1	3	0.2
	2	1	0.13333333
	3	2	0.4
	4	0	0
	5	0	0
	6	3	1.2
	7	1	0.46666667
	8	1	0.53333333
Px+B	9	1	0.6
	10	0	0
	0	3	0
	1	1	0.06666667
	2	0	0
	3	4	0.8
	4	1	0.26666667
	5	0	0

	6	2	0.8
	7	1	0.46666667
	8	1	0.53333333
	9	1	0.6
	10	1	0.66666667
Px			0
SA			0
TA			0

ANEXO 5. Prueba de normalidad y análisis estadístico mediante la prueba t estudent $p=0.05$ para el índice de severidad de acuerdo a la escala propuesta.

Tests para normalidad				
Test	--Estadístico--		-----p valor-----	
Shapiro-Wilk	W	0.997353	Pr < W	0.610
Kolmogorov-Smirnov	D	0.030903	Pr > D	>0.150
Cramer-von Mises	W-Sq	0.090562	Pr > W-Sq	0.152
Anderson-Darling	A-Sq	0.524059	Pr > A-Sq	0.190

t student severidad				
trat	n	media	lf 05	lf 95
1	15	2.214 ± 0.75 b	0.578	3.85
2	15	3.533 ± 0.81 ab	1.783	5.282
3	15	4.2 ± 1.11 a	2.36	6.039