



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en
San Luis Potosí, causante del permanente del jitomate
y clonación de genes relacionados con la resistencia**

Tesis que presenta
Maximiliano Tenorio Valdez

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dra. María Jazmín Abraham Juárez

San Luis Potosí, S.L.P., 18 de marzo de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en San Luis Potosí, causante del permanente del jitomate y clonación de genes relacionados con la resistencia**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Maximiliano Tenorio Valdez** y aprobada el **01 de marzo del 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Codirector de la tesis

Dra. María Jazmín Abraham Juárez
Codirector de la tesis

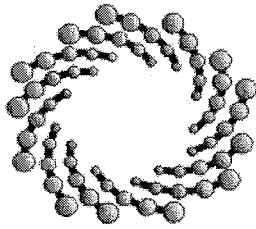
Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el los laboratorios de Biología Molecular de Plantas y en el laboratorio de Biología Molecular del Desarrollo de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Ángel Gabriel Alpuche Solís y María Jazmín Abraham Juárez

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 932676 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. También se recibió apoyo de recursos fiscales de la División de Biología Molecular



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 216 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de abril del año 2021, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda	Presidenta	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dra. María Jazmín Abraham Juárez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Maximiliano Tenorio Valdez

sobre la Tesis intitulada:

Detección de Candidatus Liberibacter solanacearum en San Luis Potosí, causante del permanente del jitomate y clonación de genes relacionados con la resistencia

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. María Jazmín Abraham Juárez
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de abril de 2021.


Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mi madre Xóchitl Patricia Valdez Dávila, a mi padre Maximiliano Tenorio Gómez
y a mi hermana Melissa Guadalupe Tenorio Valdez.

Por siempre creer en mí y darme todo su apoyo en este nuevo logro

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y a la Dra. María Jazmín Abraham Juárez por su tiempo y asesoría que dedicaron para que pudiera cumplir esta meta, y por todas las facilidades otorgadas durante mi estancia en los laboratorios de Biología Molecular de Plantas, en el laboratorio de Biología Molecular del Desarrollo de Plantas y en el LANBAMA.

Por su asesoría técnica en los experimentos a la Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo, Biól. Salvador Ambriz Granados, Q.F.B. Elvira Hernández Rico, IBt. Verónica Zárate Chávez y M.C. Ana Luz Romero García.

A los Ing. Hugo Moreno Monsiváis de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Villa de Arista San Luis Potosí, al Ing. Miguel Reyes Hernández de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Río Verde San Luis Potosí y al Ing. Omar Neri de Santa Teresita.

A mi madre Xóchitl Patricia Valdez Dávila, a mi padre Maximiliano Tenorio Gómez y a mi hermana Melissa Guadalupe Tenorio Valdez.

A todos mis compañeros de laboratorio y de generación por su apoyo y amistad.

Al Instituto Potosino de Investigación Ciencia y Tecnología

A CONACyT

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia del cultivo del jitomate	1
1.2 Principales enfermedades que afectan el jitomate	1
1.2.1 <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	2
1.3 Métodos de detección de patógenos de plantas	4
1.3.1 Signos y síntomas, ensayos microbiológicos, bioquímicos y moleculares	4
1.3.2 El papel de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	5
1.4 Mecanismos de defensa en plantas	5
1.4.1 El papel de los genes de resistencia (<i>NPR1</i> y <i>RAR1</i>) como estrategia de protección de cultivos	7
1.5 Métodos de clonación de genes de resistencia para su expresión en plantas	9
1.5.1 La tecnología Gateway y sus ventajas en la clonación de genes.	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo general	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. RESULTADOS	13
3.1 Detección del permanente del jitomate	13
3.1.1 Muestras	13

3.1.2	Identificación y obtención del fragmento 16-23S de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	16
3.1.3	Clonación del fragmento de 16S-23S en el vector pGEM-T Easy	19
3.1.4	Filogenia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	19
3.2	Amplificación y clonación de genes de resistencia NPR1 y RAR1	25
3.2.2	Amplificación de <i>NPR1</i> y <i>RAR1</i>	28
3.2.3	Clonación de los genes y <i>RAR1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el sistema de clonación Gateway	30
4.	DISCUSIÓN	35
4.1	Detección de la enfermedad del permanente del jitomate	35
4.2	Amplificación de los genes de resistencia NPR1 y RAR1	38
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1	Detección y filogenia del permanente del jitomate	41
5.1.1	Muestreo de material biológico	41
5.1.2	Extracción de ADN de plantas de jitomate y chile	41
5.1.3	Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	42
5.1.4	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Top 10 por el método de CaCl ₂	43
5.1.5	Análisis filogenético de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	43
5.2	Amplificación y clonación de genes de resistencia	44
5.2.1	Diseño de oligonucleótidos	44
5.2.2	Amplificación de <i>NPR1</i> y <i>RAR1</i>	45
5.2.3	Clonación de genes de resistencia mediante el sistema Gateway	47
6.	CONCLUSIONES	48
7.	PRESPECTIVAS	49
	BIBLIOGRAFÍA	50

Lista de tablas

Tabla 1. Ubicación de las muestras de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) y chile (<i>Capsicum annuum</i>) analizadas para la detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> por PCR en SLP	14
Tabla 2 . Oligonucleótidos específicos para amplificar los genes <i>NPR1</i> y <i>RAR1</i> con sitios de corte <i>BamHI/XbaI</i> y <i>SacI</i> para pBI121 y con la secuencia CACC para pENTR D	26

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo biológico del vector <i>Bactericera cockerelli</i>	3
Figura 2. Ligación mediada por topoisomerasa y recombinación Gateway	10
Figura 3. Gradiente de cloruro de magnesio para mejorar las condiciones de amplificación por PCR de la región 16-23S de CaLso	17
Figura 4. Productos de amplificación esperados de la región del espaciador intergénico 16S-23S ADNr de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en plantas de jitomate y chile con sintomatología de la enfermedad	18
Figura 5. Planta de jitomate mostrando síntomas de la enfermedad permanente del jitomate	18
Figura 6. Alineamiento y comparación de las secuencias del espaciador intergénico 16-23S ADNr de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> de plantas de chile y jitomate de San Luis Potosí	23
Figura 7. Árbol filogenético del espaciador intergénico 16-23S ADNr de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	24
Figura 8. Amplificación de los genes <i>NPR1</i> y <i>RAR1</i> de <i>A. thaliana</i> con Phusion High-Fidelity PCR kit Thermo Fisher Scientific	29
Figura 9. Vector de entrada pENTR D topo (sistema Gateway)	30
Figura 10. pENTR D-TOPORAR1AtG	31
Figura 11. Verificación del fragmento del gen <i>RAR1</i> en pENTR D-TOPO por digestión	32
Figura 12. Alineamiento y comparación de la secuencia genómica de <i>RAR1</i> con UTRs de <i>A. thaliana</i>	34
Figura 13. Gel de calidad de ADN genómico e identificación de CaLso por PCR de muestras de jitomate y chile	42

Resumen

Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en San Luis Potosí, causante del permanente del jitomate y clonación de genes relacionados con la resistencia

El jitomate es considerado la hortaliza número uno en consumo a nivel mundial registrando una tendencia al alza en las últimas décadas. Existen diferentes factores que afectan su producción, por ejemplo, la enfermedad del permanente del jitomate que es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso). Entre los síntomas de la enfermedad, está el aborto de flores o la producción de frutos pequeños, lo cual representa grandes pérdidas agrícolas. Para mitigar los efectos es necesario monitorear la presencia de la enfermedad en cultivos de solanáceas y desarrollar plantas resistentes. En cítricos, se están desarrollando cultivos biotecnológicos a fin de combatir HLB (Dragón amarillo) causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, mediante la sobreexpresión de los genes *NPR1* y *RAR1*. *NPR1* es un regulador clave de factores de transcripción, es el receptor del ácido salicílico y controla la expresión de genes *PR*. *RAR1* es un componente clave en la resistencia a patógenos en *A. thaliana*. El permanente del jitomate es una enfermedad emergente, por lo cual es necesario generar estrategias para combatirla como la generación de plantas de jitomate que sobreexpresen *NPR1* y *RAR1*. En este trabajo se optimizó el método de detección de CaLso por PCR mediante la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S ADN_r y fue detectada en 8 muestras de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y 2 de chile (*Capsicum annuum*) de diferentes localidades de San Luis Potosí. Se realizó el análisis filogenético de 4 muestras de jitomate y 2 de chile. Se amplificaron los genes *NPR1* y *RAR1* de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*, se clonó el gen *RAR1* de *A. thaliana* en el vector de entrada pENTR/D-TOPO del sistema Gateway y está disponible para recombinarse en cualquier vector de expresión en planta y transformar cultivares de jitomate susceptibles al permanente del jitomate, con el fin de conferirle tolerancia a CaLso.

PALABRAS CLAVE. Bacteria fitopatógena, *NPR1*, *RAR1*, clonación por recombinación, plantas resistentes.

Abstract

Detection of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in San Luis Potosí, which causes permanent disease of tomato and cloning of genes related to resistance

Tomato is considered the main vegetable in world consumption, registering an upward trend in recent decades. There are different factors affecting its production, for example, the permanent disease of tomato which is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso). Among the symptoms of the disease, there is flower abortion or production of small fruits, which represents great agricultural losses. To mitigate the effects, it is necessary to monitor the disease presence in Solanaceae crops and to develop resistant plants. In citrus, biotech crops are being developed to fight HLB (Yellow Dragon) caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus*, through the overexpression of the *NPR1* and *RAR1* genes. *NPR1* is a key regulator of transcription factors, it is the salicylic acid receptor, and controls *PR* genes expression. *RAR1* is a key component in pathogen resistance in *A. thaliana*. The permanent disease of tomato is an emerging disease, so it is necessary to generate strategies to fight it such as the generation of tomato plants overexpressing *NPR1* and *RAR1*. In this work, a PCR detection method of CaLso was optimized by amplification of the intergenic spacer 16S-23S rDNA, and it was detected in 6 tomato (*Solanum lycopersicum*) and 2 pepper (*Capsicum annuum*) samples from different locations in San Luis Potosi. The phylogenetic analysis was performed of 2 samples of pepper and 4 of tomato. The *NPR1* and *RAR1* genes of *A. thaliana* and *S. lycopersicum* were amplified, the *RAR1* gene of *A. thaliana* was cloned into pENTR/ D-TOPO entry vector using the Gateway system, and it is available for recombination to any plant expression vector and transform susceptible tomato cultivars to permanent disease of tomato, in order to confer tolerance to CaLso.

KEY WORDS. Phytopathogenic bacteria, *NPR1*, *RAR1*, recombination cloning, resistant plants.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del cultivo del jitomate

El jitomate o *Solanum lycopersicum* (*S. lycopersicum*) es considerada la hortaliza número uno a nivel mundial en volumen de producción. En la última década la producción y el consumo mundial de jitomate rojo registran una tendencia a la alza siendo China el mayor productor y consumidor, Estados Unidos el principal importador y México el principal exportador a nivel mundial con una participación en el mercado internacional del 25.11% (1,606.9 millones de toneladas) del valor de las exportaciones a nivel mundial (FIRA *et al.*, 2017; SAGARPA *et al.*, 2018). En 2016, el 56.3% de la producción nacional de jitomate en México se concentró en cinco entidades: Sinaloa con el 27.6%, San Luis Potosí con el 9.2%, Michoacán con el 7.0%, Baja California con el 6.7%, y Zacatecas con el 5.7% durante el ciclo otoño-inverno (SIAP y SAGARPA, 2016).

1.2 Principales enfermedades que afectan el jitomate

El jitomate es un cultivo que demanda un eficiente control de plagas y enfermedades por parte de los agricultores, elevando los gastos de producción al tratar de controlarlos. La variedad de plagas y enfermedades que afectan al cultivo de jitomate es muy amplia, ya que pueden ser ocasionadas por bacterias, hongos, virus, fitoplasmas y nematodos. Entre las principales podemos encontrar el cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris*, marchitamientos bacterianos que son causados por bacilos Gram negativos que pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia*, cenicilla causada por el hongo *Leveillula taurica* y *Oidiopsis taurica*, tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, pudrición de la corona y raíz causada por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), marchitez manchada causada por *tomato spotted wild virus* (TSWV), virus del mosaico del tabaco (TMV) causado por el género *Tobamovirus*, virus del mosaico del pepino (CMV) causado por la familia *Bromoviridae* y

fitoplasmosis causado por fitoplasmas (Monreal, 2005). Recientemente, debido al cambio climático, la globalización, la intensificación de la agricultura y el abuso de insecticidas y herbicidas, han surgido nuevas enfermedades como *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso). Además de que el avance tecnológico ha permitido detectar más eficientemente nuevas enfermedades y patógenos.

1.2.1 ***Candidatus Liberibacter solanacearum***

Dentro de las nuevas bacterias fitopatógenas que afectan al jitomate destaca *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso), la cual causa la enfermedad del permanente del jitomate, zebra chip en papa y brotes cloróticos del chile (Melgoza *et al.*, 2018). En 1980 se reportaron por primera vez en México los síntomas y daños de la enfermedad en la región del Bajío, en el estado de Guanajuato, pero fue hasta el 2009 que a nivel internacional se reconoció la presencia de la bacteria en los campos de jitomate del estado de Sinaloa (INTAGRI, 2017). En el 2018 se detectó el insecto vector de esta enfermedad en cultivos de jitomate, chile y papa en 14 estados de la república mexicana, mientras que en San Luis Potosí se ha detectado en jitomate y chile (El Sol de San Luis, 2019). Esta enfermedad ha dejado grandes pérdidas económicas en los cultivos a cielo abierto y en invernadero, ya que es difícil de controlar y afecta el rendimiento y la calidad del fruto.

El agente CaLso es una bacteria Gram negativa restringida al floema de las plantas y no cultivable *in vitro*. Es miembro del género *Liberibacter*, pertenece a la subdivisión Proteobacteria, su morfología es la de un bacilo con un tamaño de 2-3 μm de largo y 0.2-0.3 μm de ancho, posee una pared de peptidoglicanos apenas visible. (Delgado *et al.*, 2019; Gerardo, 2012). Lin *et al.*, 2011 llevaron a cabo estudios sobre la metagenómica de CaLso por medio de la comparación de genes ortólogos para establecer su función, además revelaron que el genoma de CaLso es un cromosoma circular de 1,258,278 pb donde se ubican tres operones completos de ARNr (16S, 23S y 5S), 45 genes que codifican ARNt y aproximadamente 35 pseudogenes.

CaLso es propagada por el vector de transmisión *Bactericera cockerelli* (*B. cockerelli*), es un insecto polífago que se alimenta del floema de una gran variedad

de plantas siendo jitomate, papa y chile las principales (Hansen *et al.*, 2008). El ciclo biológico del vector *B. cockerelli* conocida como paratrioza consta de tres etapas de desarrollo: huevecillos, ninfa (5 estados de desarrollo) y finalmente el estado adulto (Figura 1). El adulto se alimenta y deposita sus huevecillos en el haz y envés de las hojas (cerca de los bordes) una vez que estos eclosionan dan lugar a las ninfas, las cuales se desplazan al área inferior de las hojas durante todo su desarrollo (lugares protegidos y sombreados), una vez alcanzada la etapa adulta se convierten en buenos voladores y las hembras son capaces de poner en promedio 300-500 huevos durante su vida (INTAGRI, 2016).



Figura 1. Ciclo biológico del vector *Bactericera cockerelli*.

Huevecillos, ninfa (en este estadio pasa por 5 instares de desarrollo) y adulto de *B. cockerelli*. Intagri (2016). Manejo Integrado de Paratrioza. Tomada de www.intagri.com

Los principales síntomas que se presentan en jitomate al ser invadido por CaLso son clorosis de brotes apicales, hojas compuestas lanceoladas con epinastia y márgenes con coloración púrpura, necrosis, aborto de flores, hojas maduras frágiles, amarillentas y enrolladas hacia arriba, entrenudos cortos, desarrollo reducido y producción de frutos pequeños (Rojas *et al.*, 2016). A la fecha no existen controles efectivos, tratamientos o estrategias preventivas eficientes para esta enfermedad, la cual representa una amenaza para los cultivos de jitomate a nivel nacional, por lo que es de vital importancia establecer estrategias para detener la migración del vector de la enfermedad en el estado de San Luis Potosí.

1.3 Métodos de detección de patógenos de plantas

La detección de enfermedades en plantas es la principal herramienta para prevenir, reducir y evitar pérdidas económicas y de producción. Los primeros métodos de detección de patógenos utilizados en plantas fueron los basados en la observación directa de los diferentes órganos y tejidos, con el fin de detectar y reconocer síntomas o insectos (vectores de transmisión) los cuales eran asociados a una enfermedad particular. Sin embargo, este método no es preciso, ya que no siempre correlacionan los síntomas con la presencia de un patógeno específico, además de que pueden ser confundidos con factores abióticos como el estrés hídrico o salino y deficiencia o exceso de nutrientes (Hernández, 2004). Actualmente solamente las pruebas moleculares de laboratorio pueden confirmar la presencia de un patógeno en plantas con un alto grado de exactitud.

1.3.1 Signos y síntomas, ensayos microbiológicos, bioquímicos y moleculares

Entre los métodos de laboratorio para la detección de patógenos en plantas se encuentran el método microbiológico, que es el análisis tradicional para la determinación de las características del patógeno por medio de la observación de su crecimiento en medios selectivos, para comparar con las descripciones publicadas de varias especies de patógenos. Otro método es el de inmunoanálisis enzimático (ELISA, del inglés enzyme-linked immunosorbent assay), el cual se basa en el principio de reconocimiento antígeno-anticuerpo y el uso de un anticuerpo conjugado con una enzima que al reaccionar con un sustrato se produce una reacción colorimétrica (Hernández, 2004). Por último, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de detección molecular confiable para la detección e identificación de enfermedades bacterianas, fúngicas y virales. Esta técnica se basa en el uso de oligonucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean una región de interés de ADN. Los ciclos a diferentes temperaturas permiten el alineamiento de los oligonucleótidos con el ADN molde y la amplificación del fragmento de interés se lleva a cabo mediante el uso de la ADN polimerasa. Finalmente, el fragmento de interés es detectado en un gel de agarosa sometido a una electroforesis y bajo luz ultra violeta por una tinción con

bromuro de etidio u otros fluoróforos que se intercalan en las cadenas de ADN (Henson & col., 1993).

1.3.2 El papel de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Por mucho tiempo la forma de confirmar la presencia de CaLso era por medio de la detección del vector de transmisión y de los síntomas de la enfermedad, sin embargo, los síntomas pueden ser atribuidos a diferentes patógenos como hongos, bacteria, virus y fitoplasmas (Fletcher *et al.*, 2009), mientras que la presencia del *B. cockerelli* no siempre es una garantía de la presencia de CaLso. Debido a esto, se han desarrollado nuevas técnicas en los últimos años para diagnosticar de una forma más precisa la presencia de CaLso.

Actualmente, la técnica más utilizada es la PCR gracias a su especificidad y rapidez con la que se puede confirmar la presencia de la bacteria en las plantas (Delgado *et al.*, 2019). La detección de CaLso por medio de PCR está dirigida por la amplificación de las regiones ribosomales 16S, 23S y el espaciador intergénico 16-23S de su genoma (Jagoueix *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2005), esto se ha logrado a través del diseño de varios iniciadores específicos (oligonucleótidos). El diseño de oligonucleótidos universales por parte de Jagoueix y colaboradores (Jagoueix *et al.*, 1994) en combinación con el uso de oligonucleótidos específicos que amplifican la región intergénica 16-23S del ADNr diseñados por Hansen *et al.* (2008), sirven para detectar *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

1.4 Mecanismos de defensa en plantas

El desarrollo tecnológico e investigación biológica sobre los mecanismos de defensa de las plantas, nos ha permitido entender muchos aspectos sobre el sistema inmune de estos organismos, que en el pasado no eran entendidos completamente. Esto ha permitido una mejor comprensión de la interacción planta-patógeno y una mejor manipulación genética de las plantas, con el fin de lograr resistencia a enfermedades infecciosas en plantas y de mejorar las cosechas para la producción de alimentos.

Las plantas no tienen un sistema circulatorio de células móviles para la defensa de enfermedades infecciosas ni un sistema inmune adaptativo a diferencia de los animales, no obstante, estos organismos tienen mecanismos de defensa los cuales son barreras físicas (películas de cera y paredes celulares rígidas), mecanismos moleculares de resistencia y señales sistémicas (Boller & He, 2009; Zipfel, 2008). La primera línea de defensa de las plantas son varias barreras físicas en la superficie de la planta como las capas de cera, paredes celulares rígidas, lípidos cuticulares, tricomas, pelos o espinas, venas foliares, formas impares de apertura estomática, y enzimas antimicrobianas o metabolitos secundarios (Agrios, 2005; Reina & Yephremov, 2009). La segunda barrera de defensa es el reconocimiento de patógenos y la activación de defensa ya que las firmas de patógenos son reconocidas por las plantas a nivel molecular y puede llevarse en tres pasos según Jones & Dangl (2006) y Zipfel (2009):

- Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones, lo que tiene como resultado en una inmunidad activada por agentes infecciosos.
- Los patógenos exitosos implementan efectores virulentos con el fin de interferir con la actividad de los PAMPs, resultando en una susceptibilidad activada por el patógeno.
- El reconocimiento específico del patógeno por parte de la planta, por una proteína con repeticiones ricas en leucina del sitio de unión al nucleótido (NB-LRR) activa la inmunidad activada por el patógeno, lo que resulta en la resistencia al patógeno.

Esta segunda barrera de inmunidad con frecuencia culmina con una respuesta hipersensible (HR), la cual presenta muerte celular programada en el sitio de infección con el fin de aislar el patógeno, seguido por la acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) en los tejidos distales (regulación positiva) (Boller & He, 2009). Esta respuesta protege a las plantas de infecciones secundarias por medio de la activación de múltiples vías de señalización e induciendo respuestas, y se le conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Silva *et al.*, 2018). El SAR es un mecanismo de resistencia de las

plantas inducido por la infección exitosa de un patógeno, esta activación conlleva a la acumulación intracelular de ácido 2-hidroxibenzoico, conocido como ácido salicílico (SA), el cual induce una cascada de señalización que aumenta los niveles de las especies reactivas de oxígeno y la expresión de genes relacionados a la patogenicidad (*PR*) (Días Puentes, 2012). Los genes de resistencia o *PR* son los que permiten a las plantas resistir a un cierto número de patógenos por medio de la producción de proteínas R codificadas por estos genes las cuales bloquean la cascada de señalización de los efectores de patógenos. Por otro lado, la resistencia sistémica inducida (ISR) también es activada tras la colonización de las raíces por determinadas cepas bacterianas del suelo, por medio de las rutas reguladas por las hormonas etileno y ácido jasmónico (JA). Estas hormonas o reguladores de crecimiento, activan genes de defensa diferentes a los activados en SAR (Molina *et al.*, 2007). Sin embargo, existen muchos patógenos exitosos a pesar de la efectividad de los mecanismos mencionados anteriormente, debido al desarrollo de factores de virulencia como los efectores (Ojito & Porta, 2010), los cuales mimetizan o inhiben ciertas funciones celulares en las plantas. Un ejemplo de esto son los efectores AvrPto y AvrPtoB que son secretados por *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*), los cuales interactúan con el dominio cinasa de FLS2, EFR y BAK e interfieren con dicho complejo o inhibiendo la actividad cinasa de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés Pattern Recognition Receptor) (Boller & He, 2009; Heese *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007; Shen & Schulze, 2007)

1.4.1 El papel de los genes de resistencia (*NPR1* y *RAR1*) como estrategia de protección de cultivos

El factor clave de la ruta SAR es *NPR1* (non-expressor of PR1), el cual actúa como un regulador de los factores de transcripción, es el receptor del ácido salicílico que controla la expresión de genes de defensa PR. Este factor de transcripción contiene los dominios BTB/POZ y anquirina, los cuales tienen el papel de mediar la interacción del factor de transcripción con otras proteínas, además ayudan a la unión entre el efector y los promotores de los genes PR, activando su expresión (Pirnia, 2016; Zhang *et al.*, 1999). Este gen fue utilizado

por Dutt *et al.*, 2015 en el caso de cítricos, donde se reportó que una bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* causó grandes pérdidas a nivel mundial. Para poder desarrollar cultivos de portainjertos modificados de naranja dulce Hamlin y Valencia tolerante a la bacteria, se sobreexpresó el gen *NPR1* de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), lo que indujo la expresión de varios genes nativos involucrados en las vías de señalización de defensa de la planta.

Por otro lado, *RAR1* (required for Mla12 resistance, del inglés) es un componente clave en la producción de PRs. El gen *RAR1* codifica para una proteína chaperona, que se requiere para la resistencia a enfermedades y está mediada por diversos receptores de resistencia NBS-LRR en plantas (Wang *et al.*, 2008). Esta proteína chaperona contiene los dominios CHORD_I y CHORD_{II} (dominios ricos en cisteína e histidina) de unión a zinc (Shirasu, 2009; Shirasu *et al.*, 1999; Shirasu & Schulze, 2003), lo cuales son necesarios para que interactúe directamente con otras proteínas chaperonas. Por su parte Mayorga *et al.* (2018) aislaron el gen *RAR1* de plátano (*MaRAR1*), y esto reveló la presencia de dos dominios altamente conservados llamados CHORD_I y CHORD_{II}. Debido a esta relación entre los genes R de las plantas y los genes del factor de avirulencia del patógeno, este tipo de inmunidad se le conoce como resistencia gen por gen (inmunidad inducida por efectores) (Sarris *et al.*, 2016). Por otro lado, varios genes que rodean al gen *RAR1* que codifican para factores de transcripción y proteínas, han sido reportados en *A. thaliana* y arroz (homólogos) en respuestas de estrés abiótico y biótico. La sobreexpresión de dicho gen en plantas transgénicas de tabaco (T2) inhibió el crecimiento de *P. syringae*, mejorando la resistencia al patógeno.

La evidencia generada por la identificación de varios genes de resistencia y reguladores ha demostrado que las plantas usan varios mecanismos para la defensa contra diferentes patógenos (Cruz *et al.*, 2015). La sobreexpresión e inserción de estos genes ha demostrado un aumento en la resistencia contra bacterias como *Pseudomonas* en plantas (Mayorga *et al.*, 2018), lo cual podría prevenirse y controlar otras enfermedades como la enfermedad del permanente del jitomate.

1.5 Métodos de clonación de genes de resistencia para su expresión en plantas

Las técnicas de clonación permiten introducir genes de resistencia en plantas para su ensamblaje y copiado dentro del organismo receptor, esto le permite producir algún compuesto que no existía en la planta originalmente o en mayores cantidades de las originales y que le confiera una característica ventajosa a la planta (Arrambide et al., 2018).

Por lo tanto, una vez que se ha identificado una proteína que juega un papel importante en la defensa de una planta, la estrategia a seguir es clonar el gen y expresarlo en otra especie de interés agronómico, sin embargo, a pesar del avance de las técnicas de biología molecular, no siempre es una tarea fácil el amplificar y clonar un gen por métodos tradicionales como el uso de enzimas de restricción. El método tradicional de clonación requiere varios pasos para obtener de forma exitosa una construcción de interés, ya que se transfiere solo un fragmento de ADN desde un plásmido donante o producto de PCR a un vector receptor. Por estas razones, se han desarrollado nuevos métodos para facilitar y acelerar la clonación de genes. Por ejemplo, la clonación por recombinación Gateway y el método de Golden Gate. En este último se usa una enzima de restricción de tipo IIS, ligasa T4, ADN de interés y el vector receptor en un solo tubo de reacción. Cuando se requieren clonar fragmentos de varias Kpb se pueden usar alternativas como Golden Gate, que en un solo paso amplifica y clona el gen (Engler & Marillonnet, 2014).

1.5.1 La tecnología Gateway y sus ventajas en la clonación de genes.

La tecnología de clonación Gateway es un método de clonación que se basa en las propiedades del bacteriófago Lambda de recombinación sitio específica, lo cual facilita la integración del bacteriófago en el cromosoma de *E. coli* (pBAD/Thio His TOPO manual), reduciendo la necesidad de usar la clonación tradicional mediada por una enzima ligasa. Esta técnica usa la PCR para amplificar la secuencia de ADN de interés con oligonucleótidos específicos con una secuencia CACC en el extremo 5' del oligonucleótido directo. La integración de CACC a la secuencia de interés permite mover la secuencia al vector de entrada pENTR / D-TOPO por

medio del uso de la topoisomerasa, llevando a cabo una clonación direccional, lo que da como resultado un plásmido con la secuencia de interés flanqueado por los extremos attL1 y attL2 (pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits). Una vez hecho esto, la secuencia de interés puede recombinarse por medio de una reacción de recombinación LR, lo que permite transferir la secuencia a un vector de expresión (Figura 2) (Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

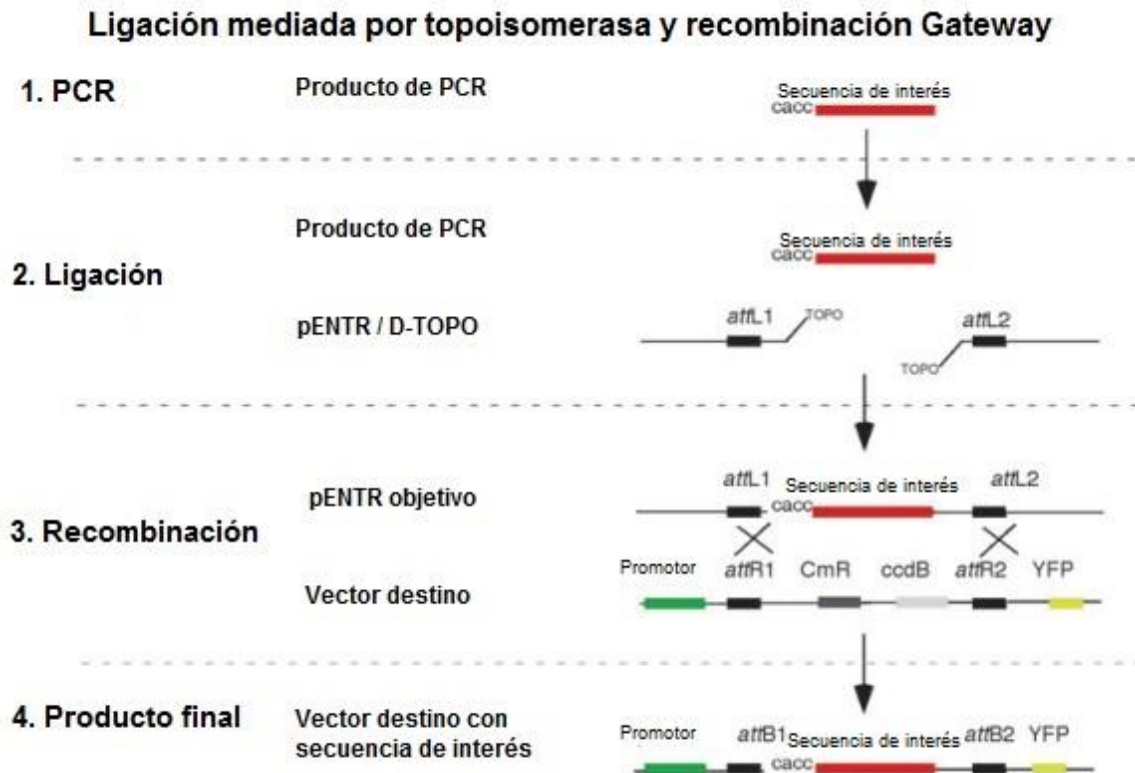


Figura 2. Ligación mediada por topoisomerasa y recombinación Gateway.

(1) Secuencia de interés se amplifica por PCR con oligonucleótido 5' que tiene la secuencia CACC. (2) Reacción de ligación de los productos de PCR con el vector pENTR / D-TOPO, el cual contiene topoisomerasa I. (3) Recombinación del plásmido con LR clonasa entre los sitios attL y attR, gen de resistencia al cloranfenicol (CmR) y el gen letal ccdB. (4) Plásmido Final con la secuencia de interés (Modificado de Earley *et al.*, 2006).

Esta nueva tecnología se desarrolló para clonar fragmentos de ADN de forma individual o múltiple en sentido, con el fin de analizar la expresión de genes en diferentes sistemas de expresión. Entre algunas de sus ventajas podemos

encontrar que no requiere de digestiones, recombinaciones reversibles, no hay ganancia ni pérdida de nucleótidos durante la transferencia, posibilidad de transferencia multisitio, variedad de sitios de recombinación y permite el uso de múltiples vectores destino. Lo que da como resultado un protocolo de clonación rápido, eficiente y robusto para la producción de un vector binario compatible con el sistema de transformación por *Agrobacterium* en plantas (Earley *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar los cultivos de jitomate y chile en San Luis Potosí en búsqueda del permanente del jitomate y de brotes cloróticos en chile.

2.2 Objetivos específicos

1. Monitorear la distribución de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* mediante técnicas moleculares en cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*) en San Luis Potosí.
2. Amplificar y clonar los genes de resistencia *NPR1* y *RAR1* de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) y *Solanum arcanum* (*S. arcanum*).

3. RESULTADOS

3.1 Detección del permanente del jitomate

3.1.1 Muestreos

El muestreo se realizó en los meses de mayo y octubre del 2019 en los municipios de Ciudad Fernández (colonia 20 de noviembre), San Luis Potosí (rancho la Morita y Cerritos de Zavala) y Villa de Guadalupe (Santa Teresita), en SLP. Se contactó al Ing. Miguel Reyes de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Rio Verde, al Ing. Hugo Moreno Monsiváis de Villa de Arista de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Villa de Arista, SLP y al Ing. Omar Neri de Santa Teresita. En total se recolectaron 44 muestras de tejido de plantas de jitomate (paisano y saladette) y chile (plata) a cielo abierto y en invernadero (Tabla 1). Las cuales tenían sintomatología típica (hojas enchinadas y acartonadas con forma de cuchara y clorosis) o presencia del vector de transmisión *B. cockerelli*.

Tabla 1. Ubicación de las muestras de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annum*) analizadas para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* por PCR en SLP.

	Estado	Municipio	Poblado/colonia	Coordenadas	Productor	Muestra	Variedad	Comentarios	Resultado
M1	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hojas con síntomas de clorosis	Positivo
M2	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hojas con síntomas de clorosis	Negativo
M3	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hojas con vector adulto	Negativo
M4	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hoja y tallo con presencia de ninfas y vectores adultos	Negativo
M5	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hojas con presencia de huevecillos de paratíroza	Negativo
M6	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hojas con presencia de huevecillos y ninfas de paratíroza	Negativo
M7	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'19.1"N 100°03'13.4"W	Ignacio Martínez	Planta de chile serrano	Plata	Hojas con síntomas de clorosis	Positivo
M8	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'17.5"N 100°03'06.9"W	Jaime Martínez	Planta de jitomate	China	Hojas con síntomas de permanente	Positivo
M9	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'17.5"N 100°03'06.9"W	Jaime Martínez	Planta de	China	Hojas con síntomas de	Positivo

						jitomate		permanente	
M10	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'17.5"N 100°03'06.9"W	Jaime Martínez	Planta de jitomate	China	Hojas con síntomas de permanente	Positivo
M11	San Luis Potosí	Ciudad Fernández	20 de noviembre	21°59'17.5"N 100°03'06.9"W	Jaime Martínez	Planta de jitomate	China	Hojas con síntomas de permanente	Positivo
M12	San Luis Potosí	Villa de Guadalupe	Santa Teresita	23°01'17.1" N 100°30'17.5" W	Rafael Álvarez	Planta de jitomate	Paisano	Hojas con síntomas de permanente y presencia de vector adulto	Negativo
M13	San Luis Potosí	Villa de Guadalupe	Santa Teresita	23°01'17.1" N 100°30'17.5" W	Rafael Álvarez	Planta de jitomate	Paisano	Planta con vector adulto	Negativo
M14	San Luis Potosí	Villa de Guadalupe	Santa Teresita	23°01'17.1" N 100°30'17.5" W	Rafael Álvarez	Planta de jitomate	Paisano	Planta con síntomas de permanente y presencia de vector adulto	Positivo
M15	San Luis Potosí	Villa de Guadalupe	Santa Teresita	23°01'29.9"N 100°32'16.8"W	Armando Rodríguez	Planta de jitomate	NR	Planta con síntomas de permanente y presencia de vector adulto	Negativo
M16	San Luis Potosí	Villa de Guadalupe	Santa Teresita	23°01'29.9"N 100°32'16.8"W	Armando Rodríguez	Planta de jitomate	NR	Hojas con presencia de ninfas de paratiroza	Negativo
M17	San Luis Potosí	Villa de Guadalupe	Santa Teresita	23°01'29.9"N 100°32'16.8"W	Armando Rodríguez	Vector	NR	Planta con síntomas de permanente	Positivo

3.1.2 Identificación y obtención del fragmento 16-23S de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación la QFB. Elvira Hernández, basada en los protocolos de Hansen *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2008, detectó la enfermedad del permanente del jitomate, mediante la amplificación por PCR y secuenciación del espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de chile en San Luis Potosí. Posteriormente la IBt. Verónica Zárate realizó adecuaciones del protocolo para detectar la misma enfermedad en cultivos de jitomate en su trabajo de tesis de licenciatura (Zárate V, 2019).

En el presente trabajo se dio continuidad a la detección de la enfermedad en jitomate y chile en regiones diferentes del estado de SLP y además realizar la secuenciación y filogenia de las muestras que resultaran positivas, con el fin de monitorear la presencia de esta enfermedad y su variabilidad genética.

Inicialmente siguiendo el protocolo de *Dellaporta et al.*, en 1983, se realizó la extracción de ADN genómico y mediante PCR detectamos 6 muestras positivas de 17 muestras con sintomatología (Figura 4B) y consideramos que podía haber algunas que no se estaban detectando por problemas del protocolo de PCR. Por lo que posteriormente se realizó un gradiente de cloruro de magnesio a diferentes concentraciones (2.1, 2.3 y 2.5 mM) a la muestra #9 de jitomate (carril 1 y 2) y a la muestra #14 de jitomate (carril 3 y 4) recolectadas durante el primer muestreo, obteniendo los mejores resultados con $MgCl_2$ a 2.5 mM (Figura 3).

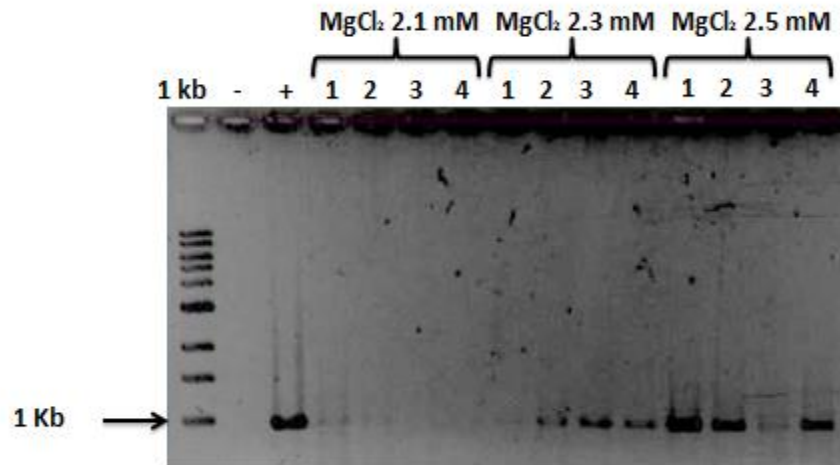


Figura 3. Gradiente de cloruro de magnesio para mejorar las condiciones de amplificación por PCR de la región 16-23S de *CaLso*.

Amplificación del espaciador intergénico 16-23S de *CaLso* por PCR de las muestras, carril 1 y 2: muestra nueve de jitomate; carril 3 y 4: muestra catorce de jitomate. En los corchetes se muestran las 3 concentraciones utilizadas en este gradiente (2.1, 2.3 y 2.5 mM) de $MgCl_2$, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder de New England BioLabs (1 kb), Control negativo (-), Control positivo espaciador intergénico 16-23S de *CaLso* (+).

Se amplificó de manera exitosa por medio de PCR, 8 muestras con un tamaño aproximado de 946 pb de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Figura 4), a partir de las muestras recolectadas en campo (Tabla 1). Seis de las muestras positivas fueron de plantas de jitomate, mientras que dos muestras positivas fueron de plantas de chile. Los síntomas de la enfermedad se presentaron tanto en las plantas de jitomate como en las de chile correspondía a la reportada en la literatura, observándose plantas achaparradas, hojas enrolladas, quebradizas y amarillentas (Figura 5), de acuerdo a lo reportado por Reveles *et al.*, en 2016.

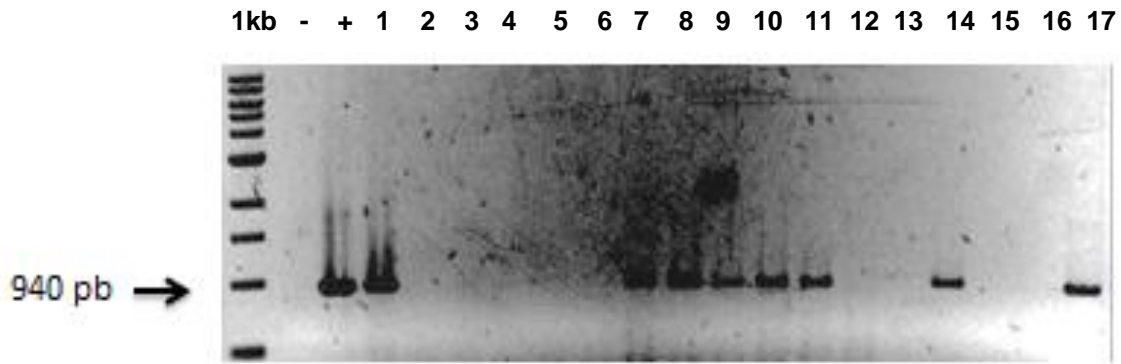


Figura 4. Productos de amplificación esperados de la región del espaciador intergénico 16S-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de jitomate y chile con sintomatología de la enfermedad.

Amplificación con los oligonucleótidos 1611F y 480R. Amplicón de la región 16-23S de la bacteria CaLso de muestras de chile y jitomate. Carril 1 a 11 y 17 (Ciudad Fernández), Carril 12 a 16 (Villa de Guadalupe), Carril 1 a 7 (chile), Carril 8 a 17 (jitomate). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder de New England BioLabs (1kb), Control negativo (-), Control positivo espaciador intergénico 16-23S de CaLso (+).



Figura 5. Planta de jitomate mostrando síntomas de la enfermedad permanente del jitomate.

Planta achaparrada, con amarillamiento y deformación de las hojas.

3.1.3 Clonación del fragmento de 16S-23S en el vector pGEM-T Easy

Una vez purificados los productos de PCR del fragmento 16S-23S. Se realizó una ligación para ser clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de la transformación de *E. coli* TOP10 y se llevó a cabo la purificación del DNA plasmídico por miniprep, dichas construcciones se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* (Invitrogen) para liberar el inserto clonado. Los fragmentos clonados se corroboraron por secuenciación.

3.1.4 Filogenia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Con el propósito de verificar la identidad del producto amplificado por PCR, del espaciador intergénico 16S-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* clonadas en pGEM-T Easy y liberadas por digestión, se mandaron a secuenciar 8 muestras, logrando secuenciar de forma exitosa 3 secuencias de jitomate (Cd. Fernández) y 2 secuencias de chile (Cd. Fernández) de las muestras de tejido vegetal recolectadas. A las cuales se les realizó un análisis bioinformático. Las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados, en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Primero se realizó la comparación de las secuencias del Control positivo (Co), muestra uno de chile (M1c), muestra siete de chile (M7c), muestra ocho de jitomate (M8j), muestra catorce de jitomate (M14j) y muestra diecisiete de jitomate (M17j) con las registradas en NCBI (National Center for Biotechnology Information) correspondientes a los espaciadores intergénicos 16S-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

La primera comparación fue entre Co (control positivo: secuencia de nucleótidos purificada de la región 16-23S de la bacteria de una muestra de chile proporcionada por la IBt. Verónica Zárate de LANBAMA) y cLS (FJ830690), las cuales presentaron un porcentaje de identidad del 99.45%. La comparación entre M1c y cLS, presentó un porcentaje de identidad del 99.46%. La comparación de M7c y cLS presentó un porcentaje de identidad del 95.37%. La comparación de M8j y cLS presentó un porcentaje de identidad del 99.46%. La comparación de

M14j y cLS presentó un porcentaje de identidad del 98.06%. Finalmente, la comparación entre M17j y cLS presentó un porcentaje de identidad del 95.04%.

A las secuencias nucleotídicas de *Candidatus Liberibacter solanacearum* obtenidas de los productos amplificados de las muestras de Cd. Fernández, se les realizó una alineación en MEGA X. Finalmente una comparación entre ellas y el control positivo (secuencia de nucleótidos purificada de la región 16-23S de la bacteria de una muestra de Chile proporcionada por LANBAMA) en el servidor de BoxShade, donde se puede apreciar con mayor claridad las áreas conservadas (áreas negras) y las áreas con gran similitud (áreas grises) entre ellas (Figura 6). Obteniéndose un porcentaje de identidad del 97.6 % al compararse entre ellas y el control positivo.

Co	1	----AGCATAGCTCAG--CG---GTTAGAGTGCACCCCTGATAAGGGGTGAGGTTCGGTAGT
M1c	1	CACCCCAATAGCTCAGTGCG---GCTAGAGTGCACCCCTGATAAGGGGTGAGGTTCGGTAGT
M7c	1	----CTAGTAAACGGAACGGGTGACCGAATACTGA--CCAGTACCCTGGCGGGGGGGGAGT
M8j	1	-----AAAAGGCCAGGGACGCGGCGAGAGCG--ACCCGAACCAGCCGAGGACCGGTACC
M14j	1	----CTGACAAAGCAAACGGTGAATGAAAGCGGAACCAGTACCCTGGCGGGGTTCGGTAGT
M17j	1	-CTCCCAAAAGCCTCAGGCG---GTTAGAGTGCACCCCTGATAAGGGGTGAGGTTCGGTAGT
Co	52	TCGAATCTACCTGGGCCACCATTCATTCAGGCAAGGGGCCGTAGCTCAGCTGGGAGAGC
M1c	58	TCGAATCTACCTGGGCCACCATTCATTCAGGCAAGGGGCCGTAGCTCAGCTGGGAGAGC
M7c	56	TTGAGGGGGGTGGGGGTGTTTCGTAGGGGGGGAGAGAAA---CGACCAGGCCGC
M8j	55	TCGAATCTACCTGGGCCACCATTCATTCAGGCAAGGGGCCGTAGCTCAGCTGGGAGAGC
M14j	57	TCGACTCGCCCTGGGCCACCATTCATTCAGGCAAGGGGCCGTAGCTCAGCTGGGACAGC
M17j	57	TCGAATCTACCTGGGCCACCATTCATTCAGGCAAGGGGCCGTAGCTCAGCTGGGAGAGC
Co	112	GCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCGGCTCCACCAATTGCGAAT
M1c	118	GCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCGGCTCCACCAATTGCGAAT
M7c	113	GAGGGGTC--CCAGGAGGAGGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCGGCTCCACCAATTGCGAAT
M8j	114	GCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCGGCTCCACCAATTGCGAAT
M14j	117	GCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCGGCTCCACCAATTGCGAAT
M17j	117	GCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCGGCTCCACCAATTGCGAAT
Co	172	TTATAGTTTTTTTGTCTAGGGGATTTTTTTTT--AGAGCAATAGTTTTTTGAAAATTGAA
M1c	178	TTATAGTTTTTTTGTCTAGGGGATTTTTTTTTTAGAGCAATAGTTTTTTGAAAATTGAA
M7c	171	TTATAGTTTTTTTGTCTAGGGGATTTTTTTTTTAGAGCAATAGTTTTTTGAAAATTGAA

M8j 174 TTATAGTTTTTTTGTTCAGGGGATTTTTTTTTTTAGAGCAATA TTTTTTTGAAAATTGAA
M14j 177 TTATAGTTTTTTTGTTCAGGGGATTTTTTTTTTTAGAGCAATAG TTTTTTTGAAAATTGAA
M17j 177 TTATAGTTTTTTTGTTCAGGG AATTTTTTTTTTTAGAGCAATA TTTTTTTGAAAATTGAA

Co 231 TAGAAGGTAGATTTTTTTTGTATTTTTTATATTGGCA TTGTATGCGATATAGGAGGTACCG
M1c 238 TAGAAGGTAGATTTTTTTTGTATTTTTTATATTGGCA TTGTATGCGATATAGGAGGTACCG
M7c 231 GACAAGGC AATTTTTTTTGTATTTTTTATA ATGGCA TTGTAGGCA ATATAGGAGG A ACCG
M8j 234 TAAAAGGTAGATTTTTTTTGTATTTTTTATATTGGCT TTGTATGCGATATAGGAGGTACCG
M14j 237 TAGAAGGTAGATTTTTTTTGTATTTTTTATATTGGCA TTGTATGCGATATAGGAGGTACCG
M17j 237 TAAAAGGGAGATTTTTTTTGTATTTTTTATATTGGCT TTGTATGA GATATAGGAGGTACCG

Co 291 ACGTTGTATAACCGCACGTTGAA CATTATCTCAGGAAATTGGTCTATTGAAAGAGCATA
M1c 298 ACGTTGTATAACCGCACGTTGAA CATTATCTCAGGAAATTGGTCTATTGAAAGAGCATA
M7c 291 ACGTTGTATAACCGCACGTTGAA CATTATCTCAGGAAATTGGTCTATTGAAAGAGCATA
M8j 294 ACGTTGTATAACCGCACGTTGAA AATTATCTCAGGAAATTGGTCTATTGAAAGAGCATA
M14j 297 ACGTTGTATAACCGCACGTTGAA AATTATCTCAGGAAATTGGTCTATTGAAAGAGCATA
M17j 297 ACTTTGTAA AC CCGC CGTTGAA TATTATCTC CGAAATTGGTCTATTGAAAGAGCAAA

Co 351 ATTTATTTATGTTTTTTTAATTAAGAAACGTTTGTAATGAATTTTATGACGTATTGACAA
M1c 358 ATTTATTTATGTTTTTTTAATTAAGAAACGTTTGTAATGAATTTTATGACGTATTGACAA
M7c 351 ATTTATTTATGTTTTTTTAATTAAGAAACGTTTGTAATGAATTTTATGACGTATTGACAA
M8j 354 ATTTATTTATGTTTTTTTAATTAAGAAACGTTTGTAATGAATTTTATGACGTATTGACAA
M14j 357 ATTTATTTATGTTTTTTTAATTAAGAAACGTTTGTAATGAATTTTATGACGTATTGACAA
M17j 357 TTTTATTTATGTTTTTTTAATTAAGAAACGTTTGAAATGAT TTTTATGACGTATTGACAA

Co 411 TGAGAGTGATCAAGCGCGATAAGGGCATTGGT GGATGCCTTGGCATGCACAGGCATGA
M1c 418 TGAGAGTGATCAAGCGCGATAAGGGCATTGGT GGATGCCTTGGCATGCACAGGCATGA
M7c 411 TGATAGTGATCAAGCGCGATAAGGGCATTGGT GGATGCCTTGGCATGCACAGGCATGA
M8j 414 TGAGAGTGATCAAGCGCGATAAGGGCATTGGT GGATGCCTTGGCATGCACAGGCATGA
M14j 417 TGAGAGTGATCAAGCGCGATAAGGGCATTGGT GGATGCCTTGGCAGGCACAGGCATGA
M17j 417 TGAGAGTGATCAAGCGCGATA CGGACTTTTGGT GGATGCCTTGATCTGCACAGGATAAAA

Co 471 AGGACGTAATACGCTGCGATAAGCTACGGGGAGCTGCAAATGAGCATTGATCCGTAGATT
M1c 478 AGGACGTAATACGCTGCGATAAGCTACGGGGAGCTGCAAATGAGCATTGATCCGTAGATT
M7c 471 AGGACGTAATACGCTGCGATAAGCTACGGGGAGCTGCAAATGAGCATTGATCCGTAGATT
M8j 474 AGGACGTAATACGCTGCGATAAGCTACGGGGAGCTGCAAATGAGCATTGATCCGAAAATT
M14j 477 AGGACGTAATACGCTGCGATAAGCTACGGGGAGCTGCAAATGAGCATTGATCCGTAGATT
M17j 477 AAGACGTAATACGCTGCGATCAGCTACGGAGAGCTGCAAATGAGCATTGACCCATATATC

Co 531 TCCGAAATGGGGCAA CCCACCTTAGATGTCTAGGAAAGTATACTATTAAGGTTTAATTTTC
 M1c 538 TCCGAAATGGGGCAA CCCACCTTAGATGTCTAGGAAAGTATACTATTAAGGTTTAATTTTC
 M7c 531 TCCGAAATGGGGCAA CCCACCTTAGATGTCTAGGAAAGTATACTATTAAGGTTTAATTTTC
 M8j 534 TCCGAAATGGGGCAA CCCACCTTAGATGTCTAGGAAAGTATACTATTAAGGTTTAATTTTC
 M14j 537 TCCGAAATGGGGCAA CCCACCTTAGATGTCTAGGAAAGTATACTATTAAGGTTTAATTTTC
 M17j 537 TCAGAAATGGGGCAA CCCACCTTAGATGTCTAGGAAAGTATACTATTAAGGTTTAATTTTC

Co 591 TAGGTATTTGAAGGTATCTTTACCTGAATAAAAATAGGGTAAAAGAAGCGAACGCA GGGAA
 M1c 598 TAGGTATTTGAAGGTATCTTTACCTGAATAAAAATAGGGTAAAAGAAGCGAACGCA GGGAA
 M7c 591 TAGGTATTTGAAGGTATCTTTACCTGAATAAAAATAGGGTAAAAGAAGCGAACGCA GGGAA
 M8j 594 TAGGTATTTGAAGGTATCTTTACCTGAATAAAAATAGGGTAAAAGAAGCGAACGCA GGGAA
 M14j 597 TAGGTATTTGAAGGTATCTTTACCTGAATAAAAATAGGGTAAAAGAAGCGAACGCA GGGAA
 M17j 597 TAGGTATTTGAAGGTATCTTTACCTGAATAAAAATAGGGTAAAAGAAGCGAACGCA GGGAA

Co 651 CTGAAACATCTAA GTACCTGTAGGAAAGGACATCAATTGAGACTCCGTTAGTAGTGGCG
 M1c 658 CTGAAACATCTAA GTACCTGTAGGAAAGGACATCAATTGAGACTCCGTTAGTAGTGGCG
 M7c 651 CTGAAACATCTAA GTACCTGTAGGAAAGGACATCAATTGAGACTCCGTTAGTAGTGGCG
 M8j 654 CTGAAACATCTAA G-----
 M14j 657 CTGAAACATCTAA GTACCTGTAGGAAAGGACATCAATTGAGACTCCGTTAGTAGTGGCG
 M17j 657 CTGAAACATCTAA GTACCTGTAGGAAAGGACATCAATTGAGACTCCGTTAGTAGTGGCG

Co 710 AGCGAACGCGGATCAGGCCAGTGCTAGG GAAGATTTAAGTAGAAT TATCTGGGAAGGTA
 M1c 717 AGCGAACGCGGATCAGGCCAGTGCTAGG GAAGATTTAAGTAGAAT TATCTGGGAAGGTA
 M7c 710 AGCGAACGCGGATCAGGCCAGTGCTAGG GAAGATTTAAGTAGAAT TATCTGGGAAGGTA
 M8j -----
 M14j 717 AGCGAACGCGGATCAGGCCAGTGCTAGG GAAGATTTAAGTAGAAT TATCTGGGAAGGTA
 M17j 716 AGCGAACGCGGATCAGGCCAGTGCTAGG GAAGATTTAAGTAGAAT TATCTGGGAAGGTA

Co 769 AGCCATAGAAGG TCATAGCCCCGTACA CGTAA --TAAATTTTCTCTATCCTT GAGTAGG
 M1c 776 AGCCATAGAAGG TCATAGCCCCGTACA CGTAA --TAAATTTTCTCTATCCTT GAGTAGG
 M7c 769 ACCCATAGAAGG TGATAGCCCCGTACAACGTAAATAAT TTTTCTCTATCCTT GAGTAGG
 M8j -----
 M14j 777 AGCCATAGAAGG TGATAGCCCCGTACA CGTAA TAAATTTTCTCTATCCTT GAGTAGG
 M17j 774 ACCCATAGAAGG TCATAGCCCCGTACA CATAA --TAAATTTTCTCTATCCTT GAGTAGG

Co 825 GCGGGACACGTGAAATCC TGTTC GAAGATGGGG --CGACCACGCTCCAAGCCTAAG--
 M1c 833 GCGGGACACGTGAAATCC TGTTC GAAGATGGGG --CGACCACGCTCCAAGCCTAAG--

```

M7c      829  G C C G G G A C A C G T G A A A A T C C T G T T T T G A A G A T G G G G G C G A A C C A C C C C C C A A G C C C T A A T
M8j      -----
M14j     834  G G C G G G A C A C G G T G A A A T C C T G T T T T G A A G A T G G G G G C G A A C C A C G C T C C A A G C C T A A G T
M17j     829  G C C G G C A C A C G T G A T A T T C G T G T T A G A A G A T G G G G G A G A C C A C T C T C C A A C C C T A A A C

Co       879  T A - C T C G T G C A T G - A C C G A T A G T G A C A C A A A T A T C C T G T A G G A -----
M1c      887  T A - C T C G T G C A T G - A C C G A T A G T G A - A C C A G T A C C G T G A C C G A T A C T G G A T C A T G A A C C G
M7c      889  A A C T C C G T G C A T G G A C C G A T A G T G A - A C C A G T A C G G G G A A C G A A -----
M8j      -----
M14j     892  A - - C T C G G G C A T G - A C C G A T A G T G A - A C C A T A C C C G G G A A C G G A A C T G G A A C C A G T A C G G
M17j     885  T A - C T C G T G C A - G - A C C G A T - G T G A C C C A A A T A - C G A G C A C G A T A G G G A A T C G T T A C C C G

Co       -----
M1c      944  G G C A C C G T G G C T G G A T C G T G A T C G T G G A C C G A G C G A T G A A T C G G A A C C G T G A C C G A G C A T
M7c      -----
M8j      -----
M14j     948  G G G C G G G G A G T G G A A T G G A C G T G A C G C A A G C A G A G A T G G C A G C C A C C G G A G A G T G A C A T C
M17j     940  T G A C C T G T G G T G G T T C A G T A C G C G G T C G A C G G C A G A A G T A C T G C A C C A G C G A C - A C G T A T

Co       -----
M1c      1004 G A A A C C G T A C G T G G A G A G T C T C A T T C A C T C A C G A T G A T G A C A A C T C T G C G A G A G A C C G A C
M7c      -----
M8j      -----
M14j     1008 A A G A A C G C G C G G A C G C G G A -----
M17j     999  G C -----

Co       -
M1c      1064 G
M7c      -
M8j      -
M14j     -
M17j     -

```

Figura 6. Alineamiento y comparación de las secuencias del espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* de plantas de Chile y jitomate de San Luis Potosí.

Los nucleótidos idénticos están sombreados en negro y las sustituciones conservadoras están sombreadas en gris. Las abreviaciones son las siguientes: Co, Control positivo espaciador

intergénico 16-23S de CaLso; M1c, muestra uno de chile; M7c, muestra siete de chile; M8j, muestra ocho de jitomate; M14j, muestra catorce de jitomate y M17j muestra diecisiete de jitomate.

Un análisis filogenético (Figura 7) indicó que el espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* detectado en chile y en jitomate son cercanos entre sí. Ya que las secuencias obtenidas mostraron un alto porcentaje de identidad con el control positivo y las secuencias reportadas en la base de datos de NCBI. Además, este análisis arrojó una escala de 0.10, la cual indica el número de sustituciones por unidad de longitud, por lo que sugiere pocos cambios en la secuencia del espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en este grupo de muestras. Interesantemente la muestra 7 de chile está más emparentada con la 14 de jitomate y la 1 de chile con el control positivo proporcionado por LANBAMA.

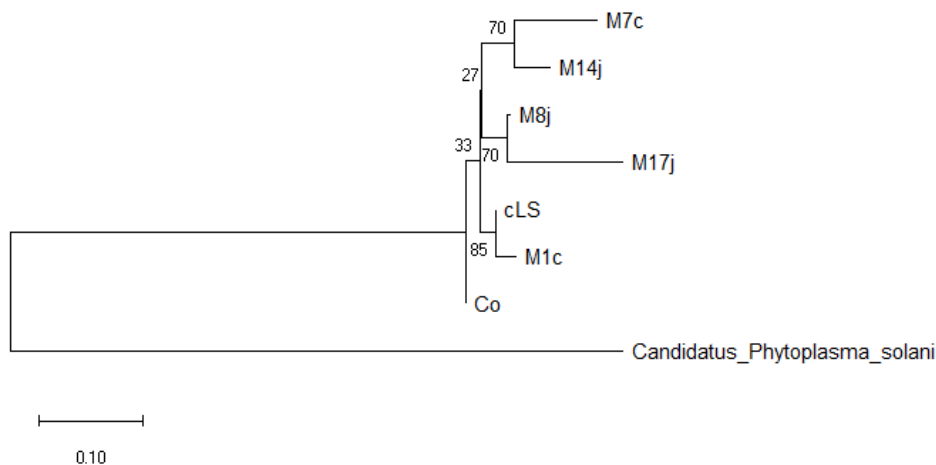


Figura 7. Árbol filogenético del espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

El árbol filogenético se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining con 500 repeticiones en MEGA X. Co es el control positivo espaciador intergénico 16-23S de CaLso, cLS es nuestra secuencia de referencia de NCBI, M1c y M7c son las secuencias obtenidas de plantas de chile, M8j, M14j y M17j son muestras obtenidas de plantas de jitomate. Como grupo externo se usó una secuencia de *Candidatus Phytoplasma solani*. Bootstrap: valor de los números en las ramas, que nos permiten saber cuán fiables son los nodos que obtenemos.

3.2 Amplificación y clonación de genes de resistencia *NPR1* y *RAR1*

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *NPR1* y *RAR1*, por medio de bases de datos y evaluadores de oligonucleótidos (Tabla 2). Asimismo, se les agregó una secuencia adicional para ser introducidos en el vector pBI 121 (*Bam*HI, *Xba*I y *Sac*I) y en el vector peNTR D-Topo (CACCC). Los resultados obtenidos fueron 8 juegos de oligonucleótidos, los cuales flanquean las regiones UTR 3' y 5' de los genes *NPR1* y *RAR1* de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* y 8 juegos de oligonucleótidos, los cuales flanquean los genes *NPR1* y *RAR1* de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* sin los UTR 3' y 5'. Los UTR son regiones río arriba y río abajo de la secuencia codificante. Se ha descrito que estas regiones son esenciales para un correcto funcionamiento, plegamiento o interacción de las proteínas codificantes con otras proteínas, y están involucradas en varios aspectos regulatorios de la expresión de genes, lo que representa una ventaja al ser incluidos en la clonación y transformación, pero al mismo tiempo aumenta la dificultad de la clonación y transformación por la obtención de un vector de mayor tamaño. Mientras que los oligonucleótidos que no amplifican las regiones UTR son útiles para llevar a cabo clonaciones y transformaciones más estables usando solamente la región codificante del gen, pero perdiendo de forma parcial o total el funcionamiento, plegamiento o interacción de las proteínas codificantes basado en el trabajo previo de Dutt en el 2015.

Tabla 2 . Oligonucleótidos específicos para amplificar los genes *NPR1* y *RAR1* con sitios de corte *BamHI/XbaI* y *SacI* para pBI121 y con la secuencia CACC para pENTR D.

Gen	Nombre	Oligos (5'->3')	Vector	Región	Referencia	GeneBank/Tair/Sol genomics	Tm °C	Amplícón	Organismo
NPR1	pENP1atF y pENP1atR	F: CACCGATGCTTCTTCATATCTCAC R: ACCTGCACATGTGGGAAGTTT	pEarleyGATE101	5' a 3' UTR	En este estudio	AT1G64280	56.6°C	2,814 pb	<i>A. thaliana</i>
NPR1	pENP51atF y pENP32atR	F: CACCATGGACACCACCATTGAT R: ACGACGATGAGAGAGTTTACGGTTAG	pEarleyGATE101	Sin UTRs	En este estudio	AT1G64280.1	56.3°C	2,664 pb	<i>A. thaliana</i>
NPR1	pENP1slF y pENP1slR	F: CACCCTTTGTTCTTCCATTTGA R: CAAAATCCACAATTATTAGTCATTTAA	pEarleyGATE101	5' a 3' UTR	En este estudio	Solyc07g040690.2.1	62.4°C	2,266 pb	<i>S. lycopersicum</i>
NPR1	pENP51slF y pENP32slR	F: CACCATGGATAGTAGAACTGCTTTTTTCG R: TTTCTAAATGGGAGATTATTGGG	pEarleyGATE101	Sin UTRs	En este estudio	Solyc07g040690.2.1	66.5°C	1,987 pb	<i>S. lycopersicum</i>
NPR1	pBINP1atF y pBINP1atR	F: GGATCCGATGCTTCTTCATATCT R: GAGCTCAGCGAACGCACCT	pBI121	5' a 3' UTR	En este estudio	AT1G64280	54°C	2,831 pb	<i>A. thaliana</i>
NPR1	pBINP51atF y pBINP32atR	F: GGATCCATGGACACCACCATT R: GAGCTCACGACGATGAGAGAG	pBI121	Sin UTRs	En este estudio	AT1G64280.1	59.3°C	2,678 pb	<i>A. thaliana</i>
NPR1	pBINP1slF y pBINP1slR	F: GGATCCCCCTTTGTTCTTCC R: GAGCTCCAAAATCCACAATTATTA	pBI121	5' a 3' UTR	En este estudio	Solyc07g040690.2.1	63.7°C	2,276 pb	<i>S. lycopersicum</i>
NPR1	pBINP51slF y pBINP32slR	F: GGATCCATGGATAGTAGAACTGC R: GAGCTCTTTCTAAATGGGAG	pBI121	Sin UTRs	En este estudio	Solyc07g040690.2.1	61.6°C	2,001 pb	<i>S. lycopersicum</i>
RAR1	pERA1atF y pERA1atR	F: CACCAATACTTTTTACTCCTACCTTCT R: GATCCAAAACACAGAAGATGAG	pEarleyGATE101	5' a 3' UTR	En este estudio	AT5G51700	51.2°C	2,001 pb	<i>A. thaliana</i>
RAR1	pERA51atF y pERA32atR	F: CACCATGGAAGTAGGATCTGCAAC R: TATCAGACCGCCGGATCAG	pEarleyGATE101	Sin UTRs	En este estudio	AT5G51700.1	57.2°C	1,775 pb	<i>A. thaliana</i>
RAR1	pERA1slF y pERA1slR	F: CACCAAGAAATAAGTTTGGGGAA R: TTATTAACAAGAGAGAATAGTGTGCAA	pEarleyGATE101	5' a 3' UTR	En este estudio	Solyc11g072290.1	62.8°C	1,153 pb	<i>S. lycopersicum</i>
RAR1	pERA51slF	F: CACCATGGAGAGACTTCGATGTCA	pEarleyGATE101	Sin	En este estudio	Solyc11g072290.1	67.6°C	679 pb	<i>S.</i>

	y pERA32sIR	R: GGACTGGGTCCTGTTGTG		UTRs	estudio				<i>lycopersicum</i>
RAR1	pBIRA1atF y pBIRA1atR	F: TCTAGAAATACTTTTTACTCCTACCTT R: GAGCTCAAACACAGAAGATGAG	pBI121	5' a 3' UTR	En este estudio	AT1G64280	54°C	2,004 pb	<i>A. thaliana</i>
RAR1	pBIRA51atF y pBIRA32atR	F: TCTAGAATGGAAGTAGGATCTGCAACG R: GAGCTCTATCAGACCGCCGGAT	pBI121	Sin UTRS	En este estudio	AT1G64280.1	62.9°C	1,783 pb	<i>A. thaliana</i>
RAR1	pBIRA1sIF y pBIRA1sIR	F: GGATCCCCAAGAAATAAGTTT R: GAGCTCTTATTAACAAGAGAGAATA	pBI121	5' a 3' UTR	En este estudio	Solyc07g040690.2.1	57.8°C	1,163 pb	S. <i>lycopersicum</i>
RAR1	pBIRA51sIF y pBIRA32sIR	F: GGATCCATGGAGAGACTTCGAT R: GAGCTCGGACTGGGTCCT	pBI121	Sin UTRs	En este estudio	Solyc07g040690.2.1	66.7°C	687 pb	S. <i>lycopersicum</i>

3.2.2 Amplificación de *NPR1* y *RAR1*

Existen reportes donde sobreexpresar genes de resistencia de otras especies, da mejores resultados que genes endógenos de especies silvestres o relacionadas, por lo que optamos por tratar de amplificar genes de jitomate y *Arabidopsis* (Silva *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2008). Para la amplificación de los genes *NPR1* y *RAR1* se realizó un análisis bioinformático para la predicción de las secuencias de dichos genes. La secuencia de ADN de *NPR1* (AT1G64280) y *RAR1* (AT5G51700) de *A. thaliana* se encuentran disponible en la base de datos de TAIR (The Arabidopsis Information Resource). Mientras que las secuencias de ADN de *NPR1* (Solyc07g040690.2.1) y *RAR1* (Solyc11g072290.1) de *Solanum arcanum* se encuentran disponible en la base de datos SGN (Sol Genomics Network). Es importante tratar de clonar secuencias de especies silvestres como *S. arcanum*, ya que ellas han reportado resistencia a varias enfermedades. Adicionalmente dichas secuencias se compararon con las secuencias de la base de datos del NCBI. Para la amplificación de ambos genes se realizó un PCR con los oligonucleótidos específicos diseñados en este estudio (Tabla 2). Las condiciones para esta reacción se estandarizaron mediante gradientes de temperatura y diferentes concentraciones de dNTPs y ADN templado. Obteniendo como resultado una correcta amplificación de ambos genes de *A. thaliana* para el sistema de clonación Gateway y para clonación por digestión y ligación en el vector pBI121. En el presente trabajo, no se logró amplificar los genes *NPR1* Y *RAR1* de *S. arcanum* a pesar de haber cambiado las condiciones de amplificación. Por lo tanto, es necesario establecer nuevas condiciones de amplificación para *NPR1* y *RAR1* de *S. arcanum* por medio de más pruebas con los parámetros mencionados anteriormente, variando cada uno de manera individual. Esto permitiría determinar los parámetros y condiciones óptimas para una correcta amplificación de ambos genes. Cabe mencionar que por motivos de la pandemia de COVID-19, solamente se pudieron probar las condiciones iniciales y algunas modificaciones en Ta y concentración de ADN. Finalmente se tomó la decisión de concentrarse en las secuencias amplificadas con el fin de aprovechar el poco tiempo disponible en laboratorio debido a la contingencia.

En la Figura 8 se pueden observar los resultados obtenidos de las amplificaciones por PCR de los genes *NPR1* y *RAR1* de las muestras vegetales recolectadas de *A. thaliana*. Algunos de estos amplicones incluyeron las regiones UTR de los genes de resistencia, y otros amplicones no incluyeron las regiones UTR. Se observan 8 fragmentos, de los cuales los primeros cuatro (carriles a-d) corresponden a los diseñados para usar el sistema Gateway, con un tamaño aproximado de 2,814, 2,664, 2,001 y 1,776 pb, respectivamente. Mientras que los fragmentos restantes (carriles e-h) a los usarse en el vector pBI121 con un tamaño de 2,831 2,085, 2,004 y 1,785 pb respectivamente.

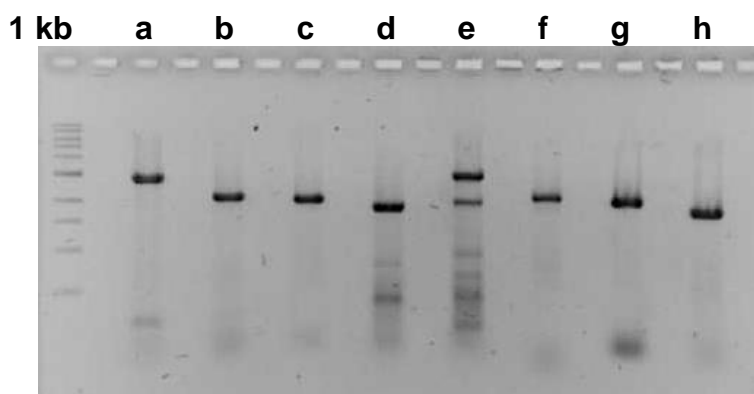


Figura 8. Amplificación de los genes *NPR1* y *RAR1* de *A. thaliana* con Phusion High-Fidelity PCR kit Thermo Fisher Scientific.

Productos para clonar en el sistema Gateway: a) Amplificación de *NPR1* con 3' y 5' UTR; b) Amplificación de *NPR1* sin 3' y 5' UTR; c) Amplificación de *RAR1* con 3' y 5' UTR; d) Amplificación de *RAR1* sin 3' y 5' UTR. Productos para clonar en el Vector pBI 121: e) Amplificación de *NPR1* con 3' y 5' UTR; f) Amplificación de *NPR1* sin 3' y 5' UTR; g) Amplificación de *RAR1* con 3' y 5' UTR; h) Amplificación de *RAR1* sin 3' y 5' UTR; marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder de New England BioLabs (1Kb).

3.2.3 Clonación de los genes y *RAR1* de *Arabidopsis thaliana* con el sistema de clonación Gateway

Se trabajó con el vector de entrada pENTR D topo (Termo Fisher Scientific Cat. K240020) del sistema de clonación Gateway, el cual fue donado por la Dra. María Abraham. El vector pENTR D topo linearizado, contiene el promotor T7 en el extremo 3' del sitio de clonación, el terminador *rrnB* T2, los sitios de recombinación *attL1* y *attL2* para transferir la información del vector de entrada (Figura 9), a cualquier vector de expresión Gateway, por recombinación LR. En el extremo *attL1* se encuentra un extremo cohesivo con el sitio GTGG, donde se insertó de manera direccional la secuencia genómica de *RAR1* con sus UTRs de *A. thaliana* (*RAR1ME*). Esto se pudo lograr gracias a que se agregó el sitio CACC al oligonucleótido forward. Al vector obtenido se le denominó pENTR D-TOPORAR1AtG (Figura 10) y fue corroborado por digestión con la enzima *BsrGI* (Figura 11).

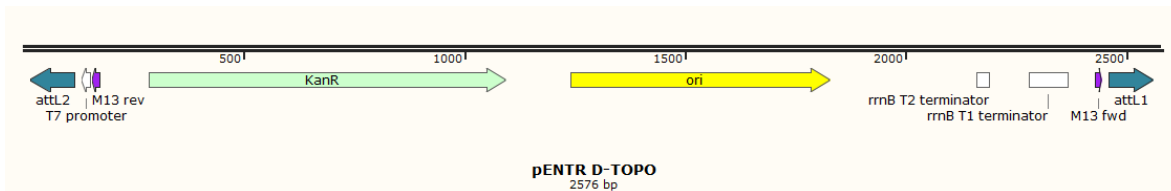


Figura 9. Vector de entrada pENTR D topo (sistema Gateway).

T7 (promotor), *rrnB* T2 (terminador), *ori* (origen de replicación), los sitios de recombinación *attL1* y *attL2*

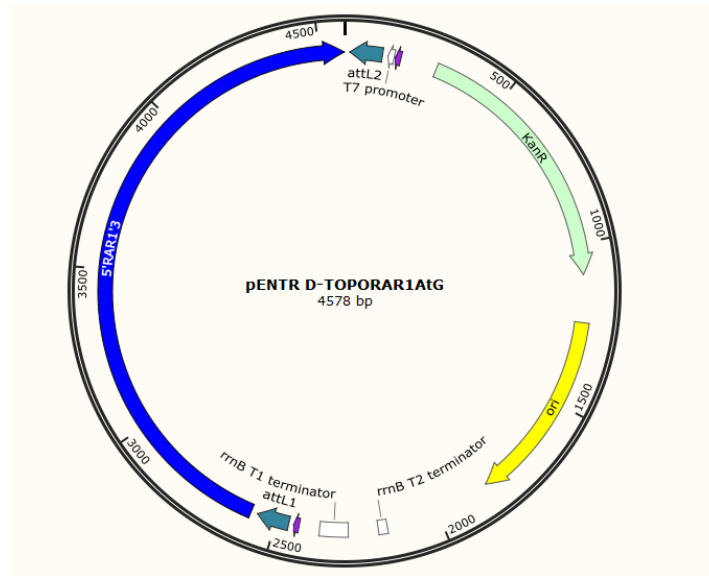


Figura 10. pENTR D-TOPORAR1AtG.

T7 (promotor), rrnB T2 (terminador), ori (origen de replicación) *attL1*, *attL2* y secuencia genómica de *RAR1* de *A. thaliana*.

Con el fin de confirmar la secuencia genómica de *RAR1* de *A. thaliana*, esta fue clonada en el vector de entrada pENTR D-TOPORAR1AtG y se mandó a secuenciar con los oligonucleótidos pERA1atF y pERA1atR, logrando secuenciar de forma exitosa esta construcción llamada RAR1ME. La muestra RAR1ME fue secuenciada con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Como primer resultado se obtuvo la comparación de la muestra RAR1ME y las registradas en NCBI (GenBank: banco de Genes). La comparación entre RAR1ME y GenBank presento un porcentaje de identidad del 98.88%.

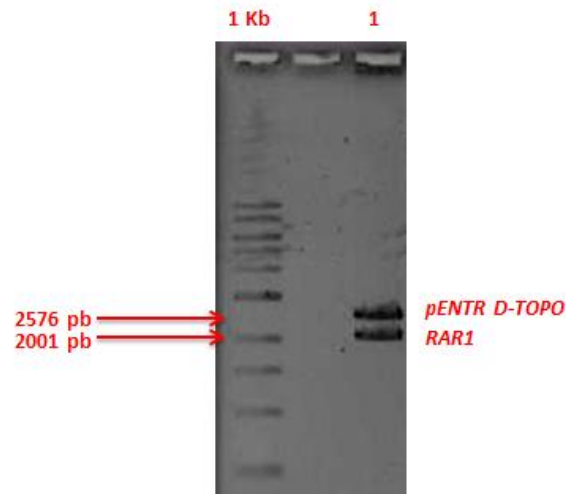


Figura 11. Verificación del fragmento del gen RAR1 en pENTR D-TOPO por digestión.

Comprobación de construcciones pENTR D-TOPORAR1AtG por medio de una digestión con la enzima *Bsr*GI. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb y en el carril uno se muestra la verificación del inserto de *RAR1* (2,001 pb) y el vector de entrada pENTR D-TOPO (2,576 pb).

A la secuencia nucleotídica de RAR1ME, se les realizó una alineación en MEGA X para finalmente comparar la secuencia obtenida de *RAR1* y la secuencia de *RAR1* de la base de datos de TAIR, en el servidor de BoxShade, donde se puede apreciar con mayor claridad las áreas conservadas (áreas negras), para conocer la homología entre ellas (Figura 12). Cabe mencionar que por cuestiones de tiempo no se pudieron clonar los genes amplificados de *S. arcanum*. Además de que no se logró clonar los genes en pBI121 con las estrategias abordadas en el proyecto. Finalmente, el gen *NPR1* de *A. thaliana* con los UTRs se logró amplificar, pero no se logró introducir de manera exitosa en pENTR D-TOPO.

RAR1t	1	CACCAATACTTTTTACTCCTACCTTCTCAA	TTCG	TCCGAT	TTCT	TCA	CAAATTCACGAGA
RARIME1	1	-----T	TTTT	TCCG	AATT	TTC	CAAATTCACGAGA
RAR1t	61	GAGATAATGGAAGTAGGATCTGCAACGAAGAAGCTTCAGTGCCAACGTATTGGCTGCAAC					
RARIME1	32	GAGATAATGGAAGTAGGATCTGCAACGAAGAAGCTTCAGTGCCAACGTATTGGCTGCAAC					

RAR1t 121 **GCCATGTTACCGATGACGACAATCCTCAAGGTTCTTGTCAATTTTCATGCTTCCGTACGT**
RARIME1 92 **GCCATGTTACCGATGACGACAATCCTCAAGGTTCTTGTCAATTTTCATGCTTCCGTACGT**

RAR1t 181 **CTTCTTCTCTCCCCATCTTTAATCGATTCTTCTCTTTCTTTTCTAAGTCTTCGATAGTTT**
RARIME1 152 **CTTCTTCTCTCCCCATCTTTAATCGATTCTTCTCTTTCTTTTCTAAGTCTTCGATAGTTT**

RAR1t 241 **CTGATAAACCCATAGAGTAGCTTTTGAATTTGATTTTATGATGTGAGGTTACGAATTTCCG**
RARIME1 212 **CTGATAAACCCATAGAGTAGCTTTTGAATTTGATTTTATGATGTGAGGTTACGAATTTCCG**

RAR1t 301 **ATTTTTGATCATGAGAAGATGATTACGCAAGTGTTTAATTAGGTTTTGGATTAGCTGATT**
RARIME1 272 **ATTTTTGATCATGAGAAGATGATTACGCAAGTGTTTAATTAGGTTTTGGATTAGCTGATT**

RAR1t 361 **GATTACATGTAGATTTTCATTTAGTTGTAAGTAAGTAAGCTTTGAACACAGCTTTGATTGT**
RARIME1 332 **GATTACATGTAGATTTTCATTTAGTTGTAAGTAAGTAAGCTTTGAACACAGCTTTGATTGT**

RAR1t 421 **CTAATTGTCAAATTTTAACTAAGTTGTTTGCTTGCAACCTATGAATTCTGTGAGACTGTG**
RARIME1 392 **CTAATTGTCAAATTTTAACTAAGTTGTTTGCTTGCAACCTATGAATTCTGTGAGACTGTG**

RAR1t 481 **AGCTTATTAGAACACTTGATGGAAGAAAGCAAAAGTATATTGCGTAAAATTGAATAATCC**
RARIME1 452 **AGCTTATTAGAACACTTGATGGAAGAAAGCAAAAGTATATTGCGTAAAATTGAATAATCC**

RAR1t 541 **AAGTATTAGATCTTTTGCCACCGTTTATGGCTATGTGAGGGAGAGTGTACGTACATGCAG**
RARIME1 512 **AAGTATTAGATCTTTTGCCACCGTTTATGGCTATGTGAGGGAGAGTGTACGTACATGCAG**

RAR1t 601 **CGACTTTTGAATTGTTTGCTTCCAACTTTGGCCACCGTTTATGGCTATGTGAGGGAGAGA**
RARIME1 572 **CGACTTTTGAATTGTTTGCTTCCAACTTTGGCCACCGTTTATGGCTATGTGAGGGAGAGA**

RAR1t 661 **GCTCGTTAAGACTGTCCCTGGAAGTGAATTAGAACAATTGTGTATAGAAAGAAGGCTTT**
RARIME1 632 **GCTCGTTAAGACTGTCCCTGGAAGTGAATTAGAACAATTGTGTATAGAAAGAAGGCTTT**

RAR1t 721 **ATCTCAATATTCATCTTAACATTTGGCCTTGTATACTAGTGTTCCTTTTCATATTCATCTA**
RARIME1 692 **ATCTCAATATTCATCTTAACATTTGGCCTTGTATACTAGTGTTCCTTTTCATATTCATCTA**

RAR1t 781 **TTGCTTTGAGCTTTTTATTGTAATTCATCTTCTTTTATTATCTTTTCTTTTCCGGTGTG**
RARIME1 752 **TTGCTTTGAGCTTTTTATTGTAATTCATCTTCTTTTATTATCTTTTCTTTTCCGGTGTG**

RAR1t 841 **GCTGGGGCTGGTCTTTGCACTGACTACTGGTTTTTGTTC AAGCAGGGAGTAAGTCAAATT**

RAR1ME1	812	GCTGGGGCTGGTCTTTGCACTGACTACTGGTTTTTTGTTCAAGCAGGGAGTAAGTCAAATT
RAR1t	901	TACTCTTCAAATACTGTTTTATGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTTCACACTCGCTTGCTCAGAGA
RAR1ME1	872	TACTCTTCAAATACTGTTTTATGTTTTTTTTTTTTTT TT GTTTCACACTCGCTTGCTCAGAGA
RAR1t	959	ATTAAAGCTACC -- AAAGTTCAAACCTGCAGCCATTTTTTT -- CACGACGGAATGAAAGAGTG
RAR1ME1	932	ATTAAAGCTACC C AAAGTTCAAACCTGCAGCCATTTTTTT TT CACGACGGAATGAAAGAGTG
RAR1t	1017	GAGCTGCTGCAAGCAAAGAAGTCATGATTTTCAGTTTGTTCTTGAAATTCAGGGTAACT
RAR1ME1	992	GAGCTGCTGCAAGCAAAGAAGTCATGATTTTCAGTTTGTTCTTGAAATTCAGGGTAACT
RAR1t	1077	AATATCCTTGTACCCCTCATAATAATTCCTCTGTCTTTTCATGGTACATATTGTAGTTGA
RAR1ME1	1052	AATATCCTTGTACCCCTCATAATAATTCCTCTGTCTTTTCATGGTACATATTGTAGTTGA

Figura 12. Alineamiento y comparación de la secuencia genómica de *RAR1* con UTRs de *A. thaliana*.

Los nucleótidos idénticos están sombreados en negro. RAR1t; secuencia de RAR1 de TAIR, RAR1ME1; secuencia de *RAR1* en el vector de entrada pENTR D-TOPO.

4. DISCUSIÓN

4.1 Detección de la enfermedad del permanente del jitomate

En la actualidad la implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades causadas por patógenos en plantas, han alcanzado una gran importancia por su efectividad, especificidad y menor tiempo requerido, en comparación de técnicas tradicionales. La forma convencional de detectar e identificar enfermedades por patógenos en plantas se realiza por la sintomatología producida por los patógenos que afectan a las plantas, e incluso muchos de los nombres de estas enfermedades deben su nombre a la sintomatología que producen en las plantas, sin embargo, muchas veces una planta puede presentar sintomatología similar para enfermedades diferentes e incluso compartir organismos vectores como la paratífoza que causa la fitoplasmosis y que se confunde con el permanente del jitomate, afortunadamente se cuenta con métodos de detección más precisos como los moleculares basados en la extracción del ADN o ARN y su amplificación de regiones específicas por PCR, ya que esta técnica es más sensible, confiable, rápida y que incluso puede detectar enfermedades antes de observarse sintomatología. Esta técnica combinada con la secuenciación de Sanger o con secuenciación de segunda generación (Next Generation Sequencing), facilita la detección de enfermedades causadas por patógenos en plantas de manera muy precisa, y por ende su estrategia de tratamiento o prevención (González *et al.*, 2017).

La literatura ha reportado un gran número de técnicas moleculares para la detección de enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos en plantas, siendo la PCR y secuenciación los métodos más populares para llevar a cabo la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, debido a que es una bacteria no cultivable (Reveles *et al.*, 2016).

Los oligonucleótidos que se usaron para amplificar el espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en el presente trabajo fueron diseñados por Hansen en el 2008, y probados por Elvira Hernández en LANBAMA recientemente. En su trabajo utilizó dicha secuencia para detectar la

enfermedad de brotes cloróticos en plantas de chile que es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Posteriormente en el estudio de una tesis de licenciatura Verónica Zárate, uso el producto de PCR del espaciador intergénico de una planta de chile clonado en un vector pGEM-T, como un control positivo para detectar la enfermedad en cultivos de jitomate mediante la técnica de PCR y evaluó el porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas mediante BLAST. En el presente trabajo realizamos adecuaciones para mejorar el protocolo de amplificación, pudiendo detectar CaLso en plantas que inicialmente daban resultados negativos y clonar los productos para secuenciarlos y realizar filogenia.

Es importante recalcar que contamos con el apoyo del personal de las Juntas Locales de Sanidad Vegetal de Villa de Arista y de RioVerde, SLP (Ing. Hugo Moreno Monsiváis e Ing. Miguel Reyes Hernández, respectivamente), quienes, con su experiencia en campo, nos apoyaron a identificar lotes con plantas que presentaban sintomatología probablemente causada por CaLso. En el análisis sobre la presencia del permanente del jitomate y clorosis del chile, las plantas de jitomate y chile mostraron daños reportados en la literatura por *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Ontiveros *et al.*, 2012), siendo los cultivos de jitomate los que presentaban síntomas más severos de la enfermedad, lo cual indica una mayor susceptibilidad en variedades comerciales de jitomate. Asimismo, se observó un mayor número de plantas afectadas en el mes de mayo del 2019 en comparación del mes de octubre del 2019, donde se apreció una disminución de los síntomas de la enfermedad y del insecto al descender la temperatura. Se ha reportado que *B. cockerelli* (psílidos conocidos como paratrioza) poseen un rango óptimo de temperatura de 21-27°C (Munyanza *et al.*, 2010), siendo 27 °C la temperatura óptima para su desarrollo (Cranshaw *et al.*, 2001).

Se detectó la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* en el 47% de las muestras de jitomate y chile con síntomas de la primera colecta. Los cultivos de jitomate presentaron una mayor incidencia a la enfermedad con 35% de casos detectados, mientras que en los cultivos de chile solamente fue del 12%. Con esta información podemos confirmar que los

síntomas son una herramienta de primera mano para la identificación del permanente del jitomate en campo, sin embargo, la presencia del vector y de los síntomas no siempre se correlaciona con la presencia de la bacteria, por lo que debemos apoyarnos de métodos de diagnóstico certeros. Actualmente solamente las pruebas moleculares del laboratorio pueden confirmar la presencia de la bacteria en solanáceas.

Ahora bien, la región clonada del espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, de las muestras con síntomas, mostró un alto porcentaje de identidad del 97.47 % respecto a las secuencias reportadas en la base de datos de NCBI. En la Figura 7, se observa la filogenia correspondiente a las secuencias de jitomate y chile de la región intergénica 16-23S ADNr de las muestras comparadas con el control positivo y *Candidatus Phytoplasma solani* (grupo externo). Además, el análisis filogenético indicó una escala de 0.10 eso significa que cada 100 nucleótidos en la historia cambiaron 0.10 veces. Por lo cual la bacteria detectada en chile y en jitomate son cercanas entre sí. Como ejemplo de lo anterior Melgoza *et al.*, 2018 realizaron un estudio para conocer la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en cultivos de jitomate y chile en México, donde se obtuvo una identidad del 99.8% en las secuencias de las muestras recolectadas de Guanajuato, San Luis Potosí y Sinaloa al compararse en bases de datos (NCBI). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se logró detectar la enfermedad del permanente del jitomate en San Luis Potosí y aumentar la sensibilidad del método de detección de PCR para detectar el amplicón correspondiente a la bacteria, los cuales se confirmaron mediante secuenciación y al compararse en GenBank. Esta información es valiosa, y debe compartirse con el personal de sanidad vegetal para que se implementen programas en diferentes regiones del estado para monitorear a la enfermedad y controlar al vector, ya que si se extiende podría causar grandes pérdidas como las causadas por CaL de cítricos. El LANBAMA en el IPICYT pudiera apoyar a los agricultores con un diagnóstico adecuado.

4.2 Amplificación de los genes de resistencia *NPR1* y *RAR1*

Uno de los principales retos de hoy en día es la identificación de genes de numerosas especies de plantas que podrían estar involucrados en la resistencia de enfermedades en especies silvestres y en plantas modelo. Las enfermedades causadas por organismos patógenos se manifiestan más en especies susceptibles o en especies domesticadas por el ser humano, porque han perdido dicha resistencia a lo largo de su evolución o por el fitomejoramiento asistido que ha tenido por enfoque el resaltar características como rendimiento, color o sabor. También puede ser por factores como la ausencia de enfermedades específicas o vectores de transmisión en una región.

S. lycopersicum es un cultivo susceptible a diversos patógenos como hongos, virus y bacterias, y dentro de las bacterias encontramos recientemente a CaLso. Los tratamientos que se han usado en los últimos años consisten en el uso de insecticidas y trampas de pegamento amarillas para controlar la población del vector transmisor del permanente del jitomate (paratrioza). Hidalgo *et al.*, 2017 llevó a cabo un estudio sobre las prácticas utilizadas por los agricultores para el control de la paratrioza en papa informando alternativas como la aplicación de insecticidas cuando encuentran la primera paratrioza en las plantas o en las trampas de pegamento amarillas. Sin embargo, estas prácticas han demostrado no ser efectivas para controlar la propagación de la enfermedad. Esta enfermedad podría prevenirse y controlarse mediante el uso de genes resistentes a la enfermedad como *NPR1* y *RAR1*. El gen *NPR1* ha demostrado ser un regulador clave de los factores de transcripción, mediando la expresión inducida por el ácido salicílico controlando la expresión de genes PR (Dutt *et al.*, 2015). En el caso de *RAR1* se ha visto que es un componente clave en la producción de proteínas de resistencia a la enfermedad (Wang *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes de resistencia (*NPR1* y *RAR1*) de *A. thaliana* y *S. arcanum*. Los cuales podrían aportar resistencia a variedades comerciales como *S. lycopersicum*. Por motivo de la pandemia de COVID-19, aunque se logró amplificar ambos genes con y sin UTRs de Arabidopsis y jitomate, sólo se pudo clonar el gen de *RAR1* de

A. thaliana con sus UTR's en el vector de entrada pENTR D topo del sistema de clonación Gateway. Es importante mencionar que la eficiencia de clonación para este sistema depende de varios factores como: una buena calidad de ADN, productos de PCR frescos, su método de transformación, un rango de libertad de 0.5°C en la temperatura de transformación y protección de los medios de cultivos de la luz directa (pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit Thermo Fisher).

Los oligonucleótidos pENP1atF, pENP1atR, pENP51atF, pENP32atR, pERA1atF, pERA1atR, pERA51atF y pERA32atR lograron amplificar los genes *NPR1* y *RAR1* respectivamente con y sin sus UTRs, cada oligonucleótido sentido tiene la secuencia CACC al inicio para ser clonados por el sistema Gateway. De la misma forma los oligonucleótidos pBINP1atF, pBINP1atR, pBINP51atF, pBINP32atR, pBIRA1atF, pBIRA1atR, pBIRA51atF y pBIRA32atR lograron amplificar *NPR1* Y *RAR1* respectivamente con y sin sus UTRs, a estos oligonucleótidos se les agregó los sitios de restricción *BamHI/XbaI* y *SacI* para ser clonados en el vector pBI121 (Figura 8). Respecto a la clonación, por cuestiones de tiempo, nos centramos en la clonación de dos fragmentos de PCR purificados. El fragmento obtenido de los oligonucleótidos pENP1atF y pENP1atR se le denominó NPR1MA, el cual contiene la secuencia nucleotídica del gen *NPR1* con UTRs de *A. thaliana*. El segundo fragmento fue el obtenido de los oligonucleótidos pERA1atF y pERA1atR denominado RAR1ME, el cual contiene la secuencia nucleotídica del gen *RAR1* con UTRs de *A. thaliana*.

Se lograron obtener dos colonias, de la cual solo una fue positiva para el inserto de *RAR1* con UTRs de *A. thaliana* y que fue confirmada por digestión y secuenciación con los oligonucleótidos pERA1atF y pERA1atR, para corroborar la presencia del gen *RAR1* de *A. thaliana* en el plásmido de la colonia. La muestra presentó un porcentaje de identidad del 98.88%, al comparar las secuencias reportadas en GenBank. Finalmente se alinearon ambas secuencias en el servidor de BoxShade, donde se puede apreciar con mayor claridad las áreas conservadas (áreas negras) para conocer la homología entre ellas (Figura 12). Por su parte, Mayorga *et al.*, 2018 reportan que el gen *RAR1* del banano está involucrado en la inmunidad en plantas. Ellos lograron amplificar por PCR, clonar la secuencia en el

vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y secuenciar el ADNc de *RAR1* de banano y obtuvieron un porcentaje de identidad del 66.7% al compararse con la secuencia de *RAR1* de *A. thaliana*. En el presente trabajo, se optó por trabajar con la secuencia de *RAR1* de *A. thaliana* y usar el sistema de clonación Gateway para que la clonación fuera direccional. Esto nos permitió tener mayor eficiencia en la clonación. Se propone transferir los genes de interés a un vector de expresión en planta, pEarleyGate 101 o pEarleyGate 104, los cuales tienen el promotor CaMV35S y una etiqueta de YFP (Yellow fluorescent protein) ya sea en el extremo 5' o 3', utilizando el método de recombinación. Por lo cual, será de gran utilidad para trabajos posteriores haber logrado la clonación del gen *RAR1* de *A. thaliana* en el vector pENTR D. Finalmente es importante mencionar que se llevó acabo la reacción de ligación para NPR1 con UTRs de *A. thaliana* en el vector pENTR D, pero no se lograron obtener colonias positivas. Esto se atribuye al gran tamaño de este gen, dando como resultado un vector poco estable y con problemas al momento de ligar los extremos del gen con los del vector pENTR D.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Detección y filogenia del permanente del jitomate

5.1.1 Muestreo de material biológico

Se recolectó tejido de 44 plantas de jitomate (*S. lycopersicum*) variedades paisano y saladette y de chile (*C. annuum*) variedad plata, a cielo abierto y en invernadero (Tabla 1). El muestreo se realizó en los meses de mayo y octubre del 2019 en los municipios de Ciudad Fernández (colonia 20 de noviembre), (rancho la Morita y Cerritos de Zavala) y Villa de Guadalupe (Santa Teresita), en SLP (Tabla 1).

Se contactó al Ing. Miguel Reyes de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Rio verde, al Ing. Hugo Moreno Monsiváis de Villa de Arista de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Villa de Arista y al Ing. Omar Neri de Santa Teresita, para que basados en su experiencia y la identificación de sintomatología y presencia del vector (psílido paratrioza) de la enfermedad se llevara a cabo la recolección de tejido vegetal de cultivos de jitomate y chile.

5.1.2 Extracción de ADN de plantas de jitomate y chile

La extracción del ADN de las muestras recolectadas (Figura 4A) se realizó mediante el protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983), modificado. Donde se utiliza buffer de extracción el cual contiene D-sorbitol 0.14 M, Tris HCL pH 8, 0.22 mM, EDTA pH 8, 0.022 mM, NaCl 0.8 M, CTAB 0.8%, N-Lauryl Sarcosina 1%, PVP 1%, β Mercaptoetanol 0.2%. Se detalla brevemente: moliendo 0.5 gramos de tejido vegetal con 500 μ L de buffer de extracción, para después incubar el extracto a 65°C por 40 min (agitando cada 10 min en vórtex) y centrifugar a 13,000 rpm por 2 min, el sobrenadante se lavó 3 veces con una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se le agregaron 2 μ L RNAsa a 10 mg/mL con una incubación de 20 min a temperatura ambiente. Después se precipitó el ADN con isopropanol frío mezclando por inversión e incubando en hielo por 5 min. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 13,000 rpm, eliminando el sobrenadante, lo cual generó una pastilla que fue lavada con 300 μ L de etanol al 70%. Finalmente se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm, eliminando el etanol y

resuspendiendo en 100 μ L de agua Milli "Q" y se almacenó a -20°C hasta su uso (Hansen *et al.*, 2008; Karunasagar *et al.*, 2004).

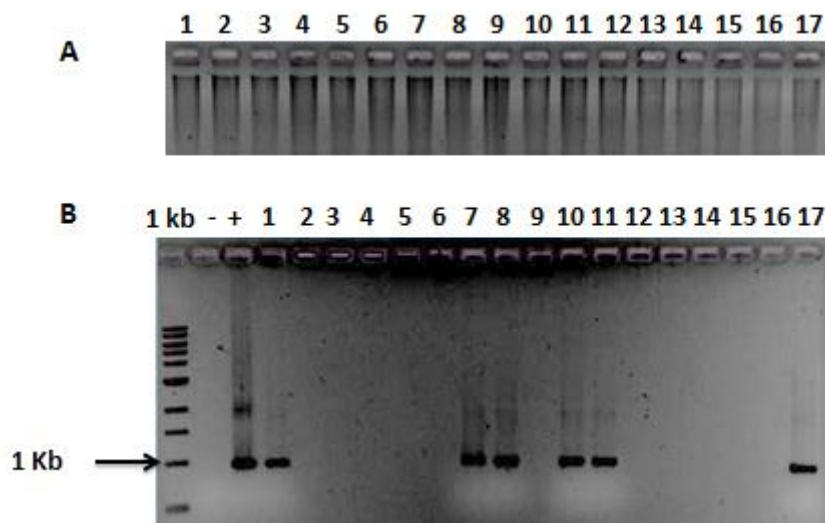


Figura 13. Gel de calidad de ADN genómico e identificación de CaLso por PCR de muestras de jitomate y chile.

(A) ADN genómico de 17 muestras de jitomate y chile, carril 1 a 11 y 17 (Ciudad Fernández), Carril 12 a 16 (villa de Guadalupe), Carril 1 a 7 (chile), Carril 8 a 17 (jitomate). (B) Amplificación por PCR del espaciador intergénico 16-23S de CaLso con una concentración de MgCl_2 2.5 mM. Marcador de peso molecular (1kb), Control negativo (-), Control positivo espaciador intergénico 16-23S de CaLso (+), la distribución y tipo de muestras es similar al inciso A.

5.1.3 Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

La detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se realizó por PCR, usando los oligonucleótidos específicos 1611F (5'GGT TGA TGG GGT CAT TTG AG'3) y 480R (5'CAC GGT ACT GGT TCA CTA TCG GTC'3) los cuales amplificaron un fragmento de 946 pb aproximadamente (Hansen *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2008). Este amplicón corresponde al espaciador intergénico 16-23S ADNr. La reacción se realizó en un termociclador Thermal Cycler BIO-RAD con una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, alineamiento (T_a) a 60°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos y un periodo final de extensión de 72°C por 10 min según el protocolo de Hansen *et al.*, (2007) modificado, donde

se utilizó MgCl_2 2.0 mM. Sin embargo, se aumentó la concentración de MgCl_2 a 2.1 mM, 2.3 mM y 2.5 mM. Finalmente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL con MgCl_2 2.5 mM, DNTPs 0.2 mM, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq polimerasa casera producida en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas, y 40 ng de ADN. Finalmente, los amplicones se analizaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz UV.

5.1.4 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 por el método de CaCl_2

Se inoculó una alícuota de la cepa TOP 10 en tubo de con 3 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) y se incubó toda la noche a 37°C a 200 rpm. Se añadieron 500 μL del preinoculo a un matraz con 50 mL de medio líquido LB (sin antibiótico) e incubó a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5 a 0.7. El cultivo se distribuyó en botellas Sorvall de 250 ml (enfriadas con anticipación) a 8,000 rpm por 10 min, se descartó inmediatamente el sobrenadante y las botellas se colocaron en un baño de hielo. A cada botella se le agrego 7.7 mL de una solución fría de CaCl_2 0.1M con glicerol al 15% para resuspender las células con un vórtex por 5 a 10 s y colocando en el hielo alternadamente. Se centrifugó las células a 8,000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante de forma inmediata, regresándolas al baño de hielo. Finalmente se repitió el procedimiento del paso anterior, pero esta vez las células se resuspendieron en 1.27 mL de la solución fría de CaCl_2 0.1M con glicerol al 15%. Las células se distribuyeron en alicotas de 35 μL en tubos eppendorf fríos, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.1.5 Análisis filogenético de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Cada uno de los productos de PCR (amplicones) se purificaron mediante columnas de promega (Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), y fueron clonados en el vector pGEM-T Easy en una proporción de 3:1

inserto-vector, con el uso de 3 U de T4 ADN ligasa (pGEM®-T Easy Vector System I).

Se descongelaron células calcio competentes por 5 a 10 min en hielo y se les adicionó 5 µL de la reacción de ligación mezclando e incubando en hielo inmediatamente por 10 a 15 min. Después fueron sometidas a un choque térmico a 42°C por 90 s, seguidos de una incubación en hielo por 20 min. Terminado este tiempo se les agregó 250 µL de medio líquido LB (sin antibiótico) y se incubaron a 37°C por 45 min en agitación a 200 rpm. Se sembraron 290 mL en medio sólido LB/ ampicilina/IPTG/X-gal. La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo por el protocolo de Binboim & Doly *et al.*, (1979). Finalmente se realizó una digestión a los miniprep con la enzima *EcoRI* de Invitrogen para ver la liberación del fragmento esperado y las clonas positivas se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). Los resultados obtenidos de la secuenciación se compararon con secuencias previamente reportadas en la base de datos del NCBI.

La alineación de las secuencias de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se realizó con el método Clustal W (MEGAX). Mientras que el árbol filogenético se construyó con el índice Neighbor-Joining (Saïto *et al.*, 1987), con un bootstrap de 500 réplicas (Felsenstein *et al.*, 1985). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

5.2 Amplificación y clonación de genes de resistencia

5.2.1 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos específicos para los genes de *NPR1* y *RAR1* de *A. thaliana* y *S. arcanum* se realizó con base en las secuencias reportadas en las bases de datos NCBI, TAIR y Sol genomics. A partir de estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos con la ayuda de los programas oligoevaluator y OligoAnalyzer para cada gen mostrados en la Tabla 2. Cada oligonucleótido contiene en los extremos los sitios de restricción *BamHI/XbaI* y *SacI* para ser clonados en el vector pBI121, mientras que para el sistema de clonación Gateway se les agregó la secuencia CACC al inicio del oligonucleótido

forward para que la clonación sea direccional en el vector de entrada pENTR D topo. En el caso de los oligonucleótidos para *NPR1* y *RAR1* de *S. arcanum*, se tomó como referencia la secuencia de *S. lycopersicum*, para amplificar ambos genes del ADN genómico de la variedad silvestre de jitomate *S. arcanum*, debido a que aún no se encuentra secuenciado en su totalidad el genoma de *S. arcanum*.

5.2.2 Amplificación de *NPR1* y *RAR1*

Se colectó tejido de *S. arcanum* y *A. thaliana* a las 17 semanas después de la germinación y la extracción del ADN de las muestras recolectadas se realizó mediante el protocolo mencionado en la sección 4.1.2.

Después de la extracción de ADN se llevó a cabo una reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos diseñados en este estudio. Las condiciones de PCR para pENP1atF y pENP1atR fueron una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, Ta a 56.6°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos, un periodo de extensión final de 72°C por 10 min. Se usó MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.4 mM, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq ADN polimerasa casera y 100 ng de ADN, en un volumen final de 25 µL. Para pENP51atF y pENP32atR se realizó una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, Ta a 56.3°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos, un periodo final de 72°C por 10 min. La mezcla maestra fue similar al caso anterior. La amplificación de pBINP1atF y pBINP1atR fue similar a las reacciones anteriores excepto la Ta que fue a 56.3°C. La mezcla maestra se preparó de manera similar al caso anterior, solo que con 80 ng de ADN.

Las condiciones de amplificación para los oligonucleótidos pBINP51atF y pBINP32atR fueron similares a las anteriores, excepto la Ta que fue a 54°C. La mezcla maestra se preparó de manera similar al caso anterior. Para pERA1atF y pERA1atR las condiciones también fueron similares a los oligonucleótidos anteriores excepto la Ta a 51.2°C. Se usó MgCl₂ 2.5 mM, DNTPs 0.4 mM, 0.38 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq polimerasa y 80 ng de ADN, en un volumen final de 25 µL. Para pERA51atF y pERA32atR la Ta fue de 57.2°C. La mezcla maestra se preparó de manera similar que el caso anterior. Para

pBIRA1atF y pBIRA1atR la Ta fue de 54°C. La mezcla maestra se preparó de manera similar que el caso anterior. Para pBIRA51atF y pBIRA32atR se realizó una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, alineamiento a 62.2°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos, un periodo final de 72°C por 10 min. En un volumen final de 25 µL con 2.5 mM de MgCl₂, 0.38 mM de dNTPs, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq ADN polimerasa y 100 ng de ADN.

En el caso de los oligonucleótidos para *NPR1* y *RAR1* de *S. arcanum*. Las condiciones que se probaron para pENP1sIF y pENP1sIR fueron una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, Ta a 55°C y 51°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos, un periodo de extensión final de 72°C por 10 min. Se usó MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.4 mM, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq ADN polimerasa casera, 100, 80 y 60 ng de ADN en un volumen final de 25 µL. Para pENP51sIF y pENP32sIR se probó una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, Ta a 59.5°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos, un periodo final de 72°C por 10 min. Se usó MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.4 mM, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq ADN polimerasa casera, 100 y 80 ng de ADN en un volumen final de 25 µL. La amplificación con pBINP1sIF y pBINP1sIR fue similar a las reacciones anteriores excepto la Ta que fue a 56.9°C. La mezcla maestra se preparó de manera similar al caso anterior, solo que con 100 ng de ADN. En el caso de pBINP51sIF y pBINP32sIR las condiciones y la mezcla fueron similares a la anterior, excepto por la Ta que fue de 55.8°C.

Las condiciones para pERA1sIF y pERA1sIR fueron una desnaturalización a 98°C por 30 segundos, alineamiento a 55.9°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1.5 minutos, un periodo final de 72°C por 10 min. En un volumen final de 25 µL con 2.5 mM de MgCl₂, 0.38 mM de dNTPs, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 3 U de Taq ADN polimerasa y 100 ng de ADN. Para pERA51sIF y pERA32sIR las condiciones fueron similares a la anterior con excepto de la Ta a 60.7°C, una mezcla similar excepto por 100 ng de ADN. Para pBIRA1sIF y pBIRA1sIR las condiciones y mezcla fueron similares al caso anterior excepto por la Ta a 51°C. Finalmente pBIRA51sIF y pBIRA32sIR se probaron también fueron probados bajo condiciones similares excepto por la Ta a 60.4°C.

5.2.3 Clonación de genes de resistencia mediante el sistema Gateway

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento de DNA deseado. Al primer Forward se le agregó al inicio la secuencia CACC para que la clonación fuera direccional. El primer Reverse no requirió ninguna modificación. Para la amplificación del fragmento de ADN se utilizó la Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad Phusion High-Fidelity PCR kit Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para visualizar el ADN con luz UV. Las bandas de interés se cortaron rápidamente para evitar la exposición prolongada a luz UV. Posteriormente se purificó el ADN de las bandas del gel mediante el uso de columnas (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). La cantidad y calidad del DNA se determinó en el Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación rápida de los productos de PCR purificados (5 a 15 minutos) en el vector de entrada pENTR D topo (Thermo Fisher Scientific Cat. K240020). La mezcla del producto de PCR purificado con el vector fue de una relación molar de 2:1 (40 ng de DNA con 20 ng de vector) se incubó a temperatura ambiente (25°C) de 5 a 15 minutos. La transformación de células competentes de *E. coli* TOP 10 se realizó por choque térmico (como en el caso anterior) y las transformantes fueron seleccionadas por medio selectivo LB con kanamicina a 50 µg/mL.

La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo por el método de Binboim & Doly *et al.*, (1979). La construcción se verificó por digestión con la enzima *BsrGI* de (New England Biolabs) para ver la liberación del fragmento esperado y por secuenciación por el método de Sanger en Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA).

6. CONCLUSIONES

1. Los cultivos de jitomate y chile en San Luis Potosí presentan signos claros de la enfermedad permanente del jitomate y brotes cloróticos de chile, y el vector paratrioza relacionado con la enfermedad causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso).
2. Es posible optimizar el método de detección por PCR de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, en muestras de jitomate y chile.
3. Es posible detectar por PCR a la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, tanto en plantas de jitomate y chile sintomáticas como en las asintomáticas.
4. El producto de amplificación del espaciador intergénico 16-23S ADNr de *Candidatus Liberibacter solanacearum* de las muestras de jitomate y chile presenta por secuenciación una homología del 97.6% a CaLso.
5. El análisis filogenético de las secuencias de CaLso indica una relación clara entre la enfermedad del permanente del jitomate y brotes cloróticos en cultivos de jitomate y chile en el estado de SLP.
6. Es posible amplificar los genes *NPR1* y *RAR1* de las muestras de *A. thaliana*.
7. Es posible clonar el gen *RAR1* de *A. thaliana* en el vector de entrada pENTR/D-TOPO del sistema Gateway.
8. La secuencia nucleotídica de *RAR1* de *A. thaliana* presenta una homología del 98.88% al compararse con la secuencia reportada en el GenBank, y está disponible para recombinarse en cualquier vector de expresión en planta y transformar jitomate susceptible al permanente del jitomate, con el fin de conferirle tolerancia a CaLso.
9. Debido a que se logró detectar esta enfermedad, se necesita generar estrategias para controlar el vector de transmisión para evitar el desarrollo de esta enfermedad. Ya que se ha encontrados en diferentes localidades del estado y no solo en casos aislados.

7. PRESPECTIVAS

1. Continuar con el monitoreo de la enfermedad permanente del jitomate y brotes cloróticos de chile en SLP en asociación con las juntas de sanidad vegetal locales.
2. Amplificar los genes de resistencia *NPR1* y *RAR1* de *S. arcanum* con los oligonucleótidos diseñados en este trabajo.
3. Clonar los genes de resistencia *NPR1* y *RAR1* de *S. arcanum* en pBI121 y pENTR D topo.
4. Transformar *Agrobacterium tumefaciens* con los genes de resistencia *NPR1* y *RAR1* de *A. thaliana* y *S. arcanum*.
5. Transformar jitomate comercial con los genes de resistencia y realizar un reto con el insecto vector proveniente de un cultivo con sintomatología de *CaLso* en un invernadero controlado.

BIBLIOGRAFÍA

- Boller T & He S. 2009. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1171647>.
- Dellaporta S, Wood J & Hicks J. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4). <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Delgado J, Beltrán M, Cerna E, Aguirre L, Landero J, Rodríguez Y, Ochoa Y. 2019. *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y control. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177>.
- Díaz Puentes L. 2012. Systemic acquired resistance induced by salicylic acid. Resistencia sistémica adquirida. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2), 257 - 267.
- Carmo D, Saillard C, Eveillard S, Danet J, Da P, Ayres A, 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(5). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63677-0>.
- Dutt M, Barthe G, Irey M, Grosser J. 2015. Transgenic citrus expressing an arabidopsis *NPR1* gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus greening). *PLoS ONE*, 10(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>.
- Earley K, Haag J, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard C. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x>.
- El Sol de San Luis. 2019. Variante de “Dragón Amarillo” podría amenazar cultivos agrícolas del país. El sol de San Luis. Recuperado de <https://www.elsoldesanluis.com.mx/local/variante-de-dragon-amarillo-podria-amenazar-cultivos-agricolas-del-pais-3601667.html>.
- Engler C & Marillonnet S. 2014. Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology*, 1116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9
- FIRA. 2017. Panorama Agroalimentario.
- Fletcher J & Wayadande A. 2009. Bacterias fastidiosas colonizadoras vasculares. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2009-0323-01>.
- González R. 2017. Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3), 591–610. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-1>.
- Hansen A, Jeong G, Paine T, Stouthamer R. 2007. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01672-07>.
- Hansen A, Trumble J, Stouthamer R, Paine T. 2008. A new huanglongbing species, “*Candidatus liberibacter psyllaureus*,” found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01268-08>.
- Henson J & French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease

- diagnostic. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 81-109.
- Hernández E. 2004. Diagnóstico de enfermedades en jitomate en el estado de San Luis Potosí, usando metodologías microbiológicas, bioquímicas, inmunológicas y moleculares. Tesis. UASLP.
- Jagouei S, Bove J, 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(3). <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379>.
- Jones J & Dangl J. 2006. The plant immune system. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- INTAGRI. 2016. Manejo Integrado de Paratrioza. Serie Fitosanidad. Num. 67. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 P.
- INTAGRI. 2017. La Enfermedad del “Permanente del Tomate”. Serie Fitosanidad. Núm. 83. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 P.
- Agrios, G. N. *Plant Pathology* 5th edn (Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005).
- Lin H, Lou B, Glynn J, Doddapaneni H, Civerolo E, Chen C, Duan Y, Zhoun L, Vahling C. 2011. The complete genome sequence of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, the bacterium associated with potato Zebra Chip disease. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019135>.
- Mayorga Á, Baas F, Limones V, Martin M, Vallejo M, Canul T, Barredo F, García S, Herrera V, Peraza S. 2018. Genomic organization, phylogeny, and functional analysis of the banana MaRAR1 gene that encodes a cochaperone of HSP90. *Plant Gene*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.08.003>.
- Melgoza C, León C, López J, Hernández L, Velarde S, Garzón J. 2018. Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), 499–509. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.267>.
- Molina A, Sánchez A. & Sánchez C. 2007. Inmunidad innata en plantas y resistencia a patógenos: nuevos conceptos y potenciales aplicaciones en protección vegetal. *Phytoma España: La Revista Profesional de Sanidad Vegetal*, (192).
- Monreal C. 2005. Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas. IPICYT, DBM. Tesis de maestría.
- Munyanza J. 2010. Psyllids as vectors of emerging bacterial diseases of annual crops. *Southwestern Entomologist*, 35(3), 471–477. <https://doi.org/10.3958/059.035.0335>.
- Ojito K & Porta O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología Vegetal*, 10(1), 3–19. Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/266>.
- Ontiveros G. 2012. Detección de ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ en papa y tomate en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Tesis de Maestría.
- Pérez H. 2017. Modelo bioinformático para predecir la resistencia a antibióticos a partir del genoma de una bacteria. Universidad Nacional de Colombia. Tesis

- de maestría.
- Pirnia S. 2016. Novel Plant DNA Binding Protein: Non-expresser of Pathogenesis Related 1 Gene (*NPR1*) Involved in Disease Resistance. Doctoral thesis, Brock University.
- Reina J & Yephremov A. 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.004>
- Reveles L, Velásquez R, Mena J, Salas S, Mauricio J. 2016. *Candidatus Liberibacter solanacearum*: un nuevo fitopatógeno en el cultivo de chile en el norte centro de México. Folleto Técnico Núm 75. Campo experimental Zacatecas. INIFAP.
- Rojas R, Zavaleta E, Ochoa D, Alanís I, García F. 2016. Association of *Candidatus liberibacter solanacearum* with the decline of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Pathology*, 98(2). <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I2.002>.
- Ryan C, Huffaker A & Yamaguchi Y. 2007. New insights into innate immunity in Arabidopsis. *Cellular Microorganismology* 9: 1902-1908.
- Sarris P, Cevik V, Dagdas G, Jones J, Krasileva K. 2016. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0228-7>.
- Shen Q & Schulze P. 2007. Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *The EMBO Journal* 26: 4293-4301.
- Shirasu K. 2009. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annual Review of Plant Biology*, 60. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092906>.
- Shirasu K, Lahaye T, Tan M, Zhou F, Azevedo C, Schulze P. 1999. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell*, 99(4). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81522-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81522-6).
- Shirasu K & Schulze P. 2003. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: Protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in Plant Science*, 8(6). [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00104-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00104-3)
- SIAP & SAGARPA. 2016. Avances y cierres de la producción agrícola.
- Siligato R, Wang X, Yadav S, Lehesranta S, Ma G, Ursache R, Sevilem I, Zhang J, Gorte M, Prasad K, Wrzaczek M, Heidstra R, Murphy A, Scheres B, Mähönen A. 2016. Multisite gateway-compatible cell type-specific gene-inducible system for plants. *Plant Physiology*, 170(2). <https://doi.org/10.1104/pp.15.01246>.
- Silva K, Mahna N, Mou Z, Folta K. 2018. *NPR1* as a transgenic crop protection strategy in horticultural species. *Horticulture Research*. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0026-1>.
- Wang Y, Gao M, Li Q, Wang L, Wang J, Jeon J, Qu N, Zhang Y, He Z. 2008. OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 294–303. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-3-0294>.
- Zárate V. 2019. Monitoreo por métodos moleculares de la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en muestras de jitomate y chile en el estado de SLP. Tesis. UnaDM.
- Zavala de la Cruz F, Luján F, Villegas L. 2015. Identificación de una secuencia

- parcial del gen *NPR1* en *Persea americana* variedad Hass “palto”. *Pueblo continente* 26. 441-452.
- Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X, Dong X. 1999. Interaction of *NPR1* with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 6523–6528.
- Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>.
- Zipfel C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>.