



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Monitoreo de *Candidatus Liberibacter* en cítricos y
solanáceas y transformación de tomate con genes que
pueden conferir resistencia al permanente de tomate.**

Tesis que presenta

Mario Hernández Ramos

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2025



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Monitoreo de *Candidatus Liberibacter* en cítricos y solanáceas y transformación de tomate con genes que pueden conferir resistencia al permanente de tomate**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mario Hernández Ramos** y aprobada el **12 de junio de 2025** 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
Director de la tesis

Dr. José Pablo Lara Ávila
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología No. de registro 1321689 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Además, se utilizó la infraestructura del LANBAMA para la realización de algunos experimentos. También recibió recursos de la convocatoria 2024-03 del COPOCYT Multas Electorales.

Dedicatorias

A mi madre Ma. Trinidad Ramos García[†] que, aunque ya no estás en este mundo sigues viva en cada uno de mis pensamientos, en cada paso que doy, en cada logro que alcanzo, tu recuerdo me acompañará siempre, este trabajo es para ti con todo mi amor.

A mí padre Mario Hernández Carrillo que a la distancia me demuestra su apoyo y siempre me motiva a seguir adelante.

A mis hermanos Ignacio por su rol en ser el hermano mayor y estar al pendiente de mí, a mí hermana Tanya por cuidarme y procurarme diariamente, a mi familia por su presencia y apoyo constante.

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por su tiempo, asesoría y consejo, por su guía y enseñanza y todas las facilidades otorgadas durante mi estancia en los laboratorios de Biología Molecular de Plantas, y en el LANBAMA.

Al Dr. Gerardo Argüello Astorga y al Dr. José Pablo Lara Ávila, por aceptar fungir como parte de mi comité tutorial, por todos sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A la Dra. Nadia Martínez Marrero, la Dra. Benita Ortega Berlanga y la Q.F.B. Elvira Hernández Rico, por su capacitación práctica, enseñanzas en el laboratorio y paciencia.

Por su asesoría técnica en los experimentos a la Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo, Biól. Salvador Ambriz Granados, IBt. Verónica Zárate Chávez. Al Ing. Miguel Reyes Hernández de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Río Verde San Luis Potosí. A la Sra. Rosita, por siempre estar al pendiente de nosotros en el laboratorio y alegrarnos el día.

A todos mis compañeros y demás personal del Laboratorio 1 y el LANBAMA, por brindarme su amistad y compartir buenos momentos; Nadia, Páez, Karen, Benita, Salvador y Vero, Melvin, Aimé, Judith, Deyanira, Valeria, Natalí, Diego y Martín.

A Perla, por su ayuda en este trabajo, por su comprensión, cariño y motivación durante este proceso.

A mis compañeros de maestría que hicieron de este viaje más ameno, Oscar, Beto, Daniel, Fausto, Armando.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda y su Laboratorio por la donación de los vectores de expresión para transformación de plantas.

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

Al CONAHCYT.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
I. Introducción	1
1.1 Importancia de los cultivos de cítricos y solanáceas	2
1.1.2 Biología y patogénesis de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	3
1.1.3 Especies de <i>Liberibacter</i>	5
1.2 Distribución geográfica y vectores	6
1.3 Enfermedades	8
1.3.1 Epidemiología en México	8
1.4 Diagnóstico y detección	9
1.5 Técnicas moleculares	11
1.6 Métodos de control	12
I) Físicos	12
II) Químicos	12
III) Biológicos	12
1.7 Mecanismos de defensa en plantas	13
1.8 Los genes de resistencia <i>npr1</i> y <i>rar1</i> como alternativa para la protección de cultivos	14
1.9 Métodos de clonación de genes de resistencia por técnicas de biología molecular	17
1.9.1 La tecnología Gateway, en la clonación de genes	17
1.9.2 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
II. Objetivos	21

2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
III. Metodología	22
3.1 Muestreo en campos de cultivo de cítricos y tomate, en Cd. Fernández, Rioverde y Villa de Arista, S.L.P.	22
3.2 Extracción de ADN genómico de muestras de cítricos y tomate colectadas en campo.	24
3.3 Detección por PCR de punto final para la amplificación del gen ADNr 16S de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> y <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> .	25
3.2.1 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Top 10 por el método de CaCl_2 .	26
3.3 Cuantificación de la carga bacteriana de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> por PCR en tiempo real en las muestras de cítricos colectadas en campo.	26
3.4 Generación de controles positivos para la enfermedad del HLB de los cítricos y del Permanente del Tomate.	27
3.5 Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> para la amplificación de los genes <i>rar1</i> y <i>npr1</i> y posterior clonación mediante el sistema Gateway.	28
3.5.1 Extracción de ADN de <i>A. thaliana</i> .	28
3.5.2 Amplificación de los genes <i>rar1</i> y <i>npr1</i> de <i>A. thaliana</i> para clonación mediante el sistema Gateway.	28
3.6 Transformación nuclear de plantas de tomate mediante las cepas LBA4404 y GV3101 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	30
3.6.1 Preparación de células electrocompetentes.	30
3.6.2 Electroporación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.6.3 Transformación nuclear de tomate mediante cocultivo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
IV. Resultados	34
4.1. Cuantificación por espectrofotometría en Nanodrop	34
4.1.2 Detección por PCR de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> para la enfermedad del HLB en cultivos de cítricos.	35
4.1.2 Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> para la enfermedad del Permanente en cultivos de tomate.	35
4.2 Cuantificación de la carga bacteriana de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> por PCR en tiempo real en las muestras de cítricos colectadas en campo.	36
4.3 Generación de controles positivos para la detección de las enfermedades ocasionadas por las especies de <i>Ca. Liberibacter</i> .	39
4.4 Clonación del gen <i>rar1</i> sin UTR de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el sistema de clonación Gateway.	40

4.4.1 Clonación del gen <i>rar1</i> con UTR de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el sistema de clonación Gateway.	42
4.4.2 Generación de dos construcciones que albergan el gen <i>rar1</i> sin UTR y con UTR de <i>A. thaliana</i> mediante el sistema de clonación Gateway.	45
4.4.3 Clonación del gen <i>npr1</i> sin UTR de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el sistema de clonación Gateway.	48
4.5 Transformación nuclear de tomate mediante co-cultivo con las cepas LBA4404 y GV3101 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
V. Discusión	52
5.1 Detección de las enfermedades ocasionadas por <i>Candidatus Liberibacter</i> spp. en San Luis Potosí.	52
5.2 Clonación de genes de resistencia	53
5.3 Métodos de transformación en plantas	55
VI. Conclusiones	57
VII. Perspectivas	58
VIII. Referencias	60
IX. Anexos	67

Lista de tablas

Tabla 1. Distribución geográfica y vectores de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	6
Tabla 2. Ubicación de muestras de cítricos y tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) para el monitoreo de <i>Ca. Liberibacter</i> spp. por técnicas moleculares en SLP.	22
Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para amplificar los genes <i>rar1</i> y <i>npr1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> con la secuencia CACC para pENTR D-TOPO del sistema Gateway.	28
Tabla 4. Medios para cultivo <i>in vitro</i> de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	32
Tabla 5. Cuantificación de ADN por espectrofotometría en Nanodrop de las muestras colectadas en campo.	34
Tabla 6. Resultados obtenidos de las muestras de cítricos.	37

Lista de figuras

Figura 1. <i>Candidatus Liberibacter</i> spp. contiene componentes básicos de la maquinaria Sec.	4
Figura 2. Vectores de las especies de <i>Candidatus Liberibacter</i> .	7
Figura 3. Sintomatología de la enfermedad del HLB en cítricos.	9
Figura 4. Comparación de tinción y coloración de cortes de hojas sanas e infectadas por HLB en cítricos por la prueba de almidón.	10
Figura 5. Ligación mediada por topoisomerasa y recombinación Gateway.	18
Figura 6. Vectores de transformación de plantas pEarleyGate.	19
Figura 7. Transformación de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	20
Figura 8. Árbol de naranja mostrando síntomas de la enfermedad del HLB y planta de tomate mostrando síntomas de la enfermedad del Permanente del Tomate.	24
Figura 9. Vector de clonación pGEM®-T Easy. Imagen tomada de SnapGene	27
Figura 10. Vector de entrada pENTR D TOPO (Sistema Gateway).	29
Figura 11. Vector de expresión pEarleyGate101 (Sistema Gateway).	30
Figura 12. Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i> y regeneración de plantas de tomate.	33
Figura 13. Detección de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> mediante PCR.	35
Figura 14. Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> mediante PCR.	36
Figura 15. PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga bacteriana de <i>CaLas</i> .	38
Figura 16. Verificación del fragmento de ADNr 16S de las especies de <i>Ca. Liberibacter</i> en pGEM®-T Easy, por PCR de colonia.	39
Figura 17. Verificación del del gen <i>rar1</i> sin UTR en pENTR D-TOPO por PCR de colonia.	40
Figura 18. Verificación del fragmento del gen <i>rar1</i> sin UTR en pENTR D-TOPO por restricción enzimática.	41
Figura 19. Blastn de la secuencia obtenida por secuenciación.	41
Figura 20. Obtención de la construcción pENTR-D TOPO + <i>rar1</i> sin UTR en el vector de entrada del sistema Gateway.	42
Figura 21. Verificación del gen <i>rar1</i> con UTR en pENTR D-TOPO por PCR de colonia.	43
Figura 22. Verificación del gen <i>rar1</i> UTR en pENTR D-TOPO por restricción enzimática.	43
Figura 23. Blastn de la secuencia obtenida por secuenciación.	44
Figura 24. Obtención de la construcción pENTR-D TOPO + <i>rar1</i> UTR en el vector de entrada del sistema Gateway.	44
Figura 25. Verificación del gen <i>rar1</i> en pEarleyGate101 por PCR de colonia. A) <i>rar1</i> sin UTR.	45
Figura 26. Obtención de la construcción pEarleyGate 101 + <i>rar1</i> sin UTR en el vector de expresión del sistema Gateway.	46
Figura 27. Obtención de la construcción pEarleyGate 101 + <i>rar1</i> UTR en el vector de expresión del sistema Gateway.	47

Figura 28. Verificación del del gen <i>npr1</i> sin UTR en pENTR D-TOPO por PCR de colonia.	48
Figura 29. Verificación del fragmento del gen <i>npr1</i> sin UTR en pENTR D-TOPO por restricción enzimática.	49
Figura 30. Blastn de la secuencia obtenida por secuenciación.	49
Figura 31. Obtención de la construcción pENTR-D TOPO + <i>npr1</i> sin UTR en el vector de entrada del sistema Gateway.	50
Figura 32. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .	51

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
CaLas	<i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus
CaLaf	<i>Candidatus</i> Liberibacter africanus
CaLam	<i>Candidatus</i> Liberibacter americanus
CaLso	<i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum
ADNr 16S	ADN ribosomal 16S
HLB	Huanglongbing
PT	Permanente del tomate
ZC	Zebra Chip
ICSB	Comité Internacional de Bacteriología Sistemática
ICSP	Comité Internacional de Sistemática Procariota
AMPs	Péptidos antimicrobianos
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
NPR1	No expresor de genes PR1
RAR1	Requerido para MLA12 resistencia 1
PR	Relacionado a patógenos
SAR	Resistencia Sistémica Adquirida
ISR	Resistencia Sistémica Inducida
SDEs	Efactor entregado por Sec
COX	Gen del citocromo oxidasa en plantas
EPPO	Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Resumen

Monitoreo de *Candidatus Liberibacter* en cítricos y solanáceas y transformación de tomate con genes que pueden conferir resistencia al permanente de tomate.

La enfermedad de cítricos conocida como Dragón amarillo o Huanglongbing (HLB) es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. En el caso de México la especie *Ca. L. asiaticus* es la responsable de esta enfermedad. Por otro lado, en el caso de las solanáceas tomate, papa, y chile, la especie responsable de la enfermedad del “permanente de tomate es *Ca. L. solanacearum*. En cítricos los insectos vectores de la enfermedad son *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*, y en el caso de las solanáceas es *Bactericera cockerelli*. Las enfermedades mencionadas se distribuyen globalmente y a la fecha no existe un método eficiente para su control, causando pérdidas millonarias. Por lo anterior, es importante el monitoreo eficiente de la enfermedad y la búsqueda de métodos de control alternativos.

En este trabajo se tomaron muestras de cítricos con sintomatología de HLB en Cd. Fernández, y Rioverde, y de tomate y chile en Villa de Arista, S.L.P. Se utilizaron técnicas moleculares basadas en PCR y qPCR para su detección y cuantificación. Además, se inició la transformación de una planta de tomate con genes que pueden conferir resistencia a estas enfermedades, como *rar1* y *npr1*.

De 12 muestras de cítricos con síntomas analizadas por PCR convencional, solo 3 dieron positivas; sin embargo, al analizarlas por qPCR todas dieron positivas. De 9 muestras de tomate solo 3 dieron positivas por PCR, pero falta implementar un método de cuantificación por qPCR en solanáceas, el cual estamos desarrollando. Los métodos de detección y cuantificación de la enfermedad son importantes para ver la eficiencia de métodos de control.

Se cuenta con plántulas de tomate presuntamente transformadas con el gen *rar1* en cultivo de tejidos. Futuros retos con el vector que porte la bacteria en condiciones controladas nos permitirán saber si tolera la enfermedad.

PALABRAS CLAVE. Huanglongbing, dragón amarillo, detección oportuna, bioestimulantes, plantas transgénicas.

Abstract

Monitoring of *Candidatus Liberibacter* in citrus and solanaceous crops and tomato transformation with genes that may confer resistance to tomato permanent.

The citrus disease known as Yellow Dragon or Huanglongbing (HLB) is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp. In Mexico, the *Ca. L. asiaticus* species is responsible for this disease. On the other hand, in vegetable crops such as tomato, potato, and pepper, the responsible species of the disease tomato permanent is *Ca. L. solanacearum*. In citrus, the insect vectors of the disease are *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae*, while in solanaceous crops, it is *Bactericera cockerelli*. The mentioned disease is globally distributed, and to date, there is no efficient control method, causing multimillion-dollar losses. Therefore, efficient disease monitoring and the search for alternative control methods are crucial.

In this study, citrus samples with HLB symptoms were collected in Cd. Fernández and Rioverde, while tomato and chili samples were taken in Villa de Arista, S.L.P. Molecular techniques based on PCR and qPCR were used for detection and quantification. Additionally, the transformation of a tomato plant was initiated with genes that may confer resistance to these diseases, such as *rar1* and *npr1*. Out of 12 symptomatic citrus samples analyzed by conventional PCR, only 3 tested positive; however, when analyzed by qPCR, all tested positive. Out of 9 tomato samples, only 3 tested positive by PCR. The implementation of a qPCR quantification method in solanaceae, which we are developing, is still pending.

Disease detection and quantification methods are important to see the efficiency of disease control methods.

Tomato seedlings putatively transformed with the *rar1* gene are currently in tissue culture. Future challenges with the vector carrying the bacterium under controlled conditions will allow us to know if it tolerates the disease.

KEY WORDS. Huanglongbing, Yellow Dragon, early detection, biostimulants, transgenic plants.

I. Introducción

El género *Candidatus Liberibacter* incluye bacterias fitopatógenas limitadas al floema de plantas, que se caracterizan por no ser cultivables en condiciones axénicas (Makam *et al.*, 2023). Son transmitidas por insectos, en los que se multiplican en el intestino y migran hacia las glándulas salivales, lo que hace posible que la bacteria sea transmitida a la planta huésped durante el proceso de ingestión de la savia contenida en el floema. Las bacterias proliferan en la planta, y se localizan intracelularmente en las células del huésped (Ammar *et al.*, 2016). Estas bacterias causan enfermedades de gran impacto económico, especialmente en cultivos de cítricos y solanáceas. Entre las especies más importantes se encuentran *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CaLaf), *Candidatus Liberibacter americanus* (CaLam), y *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso), que se distribuyen en diferentes regiones del mundo. Estas bacterias han sido identificadas como causantes de enfermedades como el Huanglongbing (HLB) o “dragón amarillo” en cítricos, el Permanente del Tomate (PT), Zebra Chip (ZC) de la papa y Brotes Cloróticos (BC) en chile (Munyanenza *et al.*, 2007; Melgoza *et al.*, 2018). En el caso de HLB en cítricos, la bacteria es transmitida por psílidos, como *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* y en el caso de PT, ZC y BC en solanáceas, la bacteria es transmitida por *Bactericera cockerelli* (Munyanenza *et al.*, 2007; Melgoza *et al.*, 2018).

El término “*Candidatus*” fue propuesto por Murray y Stackebrandt en 1995 para clasificar taxones procariotas que no pueden ser cultivados, pero cuya identificación se basa en el análisis de secuencias de ADNr 16S (Murray y Stackebrandt, 1995; Merfa *et al.*, 2019). Este sistema es particularmente útil para bacterias que han sido propuestas para ser incluidas en el género *Liberibacter*, dado que su cultivo en laboratorio no se ha logrado hasta ahora.

La imposibilidad de aislar y cultivar estas bacterias representa un gran desafío para el desarrollo de estrategias de control efectivas, lo que ha impulsado investigaciones orientadas a mejorar los métodos de detección y control, en este último caso se han

propuesto el uso de antibióticos, de bio-estimulantes, y la generación de plantas transgénicas (Zhang *et al.*, 2014a; Dutt *et al.*, 2015; Makam *et al.*, 2023).

En particular, el HLB ha causado pérdidas enormes en la producción de cítricos debido a la rápida propagación de la enfermedad, por lo que se han implementado diferentes enfoques para combatirla, desde el control de los insectos vectores hasta la implementación de métodos físicos y biotecnológicos.

1.1 Importancia de los cultivos de cítricos y solanáceas

La citricultura en México es una actividad económica muy importante, con 603,617 hectáreas cultivadas en 28 estados, que producen 8.2 millones de toneladas de cítricos con un valor superior a 34,950 millones de pesos. La producción se compone mayormente de cítricos dulces (61 %), limones (36 %) y toronja (3 %). Este sector agrícola enfrenta desafíos fitosanitarios por diversas plagas (y enfermedades asociadas a ellas), como el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), vector del HLB, el pulgón café, los ácaros de la leprosis y la mosca prieta. Para combatirlas, la Dirección General de Sanidad Vegetal implementa campañas de prevención, control y vigilancia epidemiológica, operadas por los Organismos Auxiliares de Sanidad Vegetal. Desde la primera detección del HLB en nuestro país, en 2009, las medidas fitosanitarias han logrado contenerlo en el 41 % de la superficie citrícola (243,768 hectáreas), destacando la importancia del manejo integral para reducir la dispersión de plagas (SENASICA, 2023).

Los cultivos de la familia Solanaceae, como el tomate (*Solanum lycopersicum*), la papa (*Solanum tuberosum*) y el chile (*Capsicum spp.*), son fundamentales tanto desde el punto de vista alimentario como económico a nivel mundial. Estas especies no solo representan una fuente esencial de nutrientes, sino también de empleo e innovación tecnológica en el sector agroalimentario. En México, el tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes, tanto para el consumo interno como para la exportación, principalmente a Estados Unidos y Canadá. De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2023), "el tomate es el principal producto agrícola de exportación no cerealera del país". Se cultiva en más de 90 mil hectáreas, con una producción que supera los 3 millones de toneladas

anuales, posicionando a México como uno de los tres mayores exportadores del mundo. El tomate también es clave para el desarrollo económico de regiones como Sinaloa, San Luis Potosí, Zacatecas y Michoacán, donde genera miles de empleos en los sectores agrícola e industrial. De acuerdo a la FAO (2022), "el tomate es el cultivo hortícola más producido a nivel global, con más de 189 millones de toneladas anuales". Esta hortaliza es altamente valorada por su contenido en vitaminas A, C, E, y compuestos antioxidantes como el licopeno, lo que le confiere propiedades benéficas para la salud humana (Giovannoni, 2004). Además, se ha convertido en una especie modelo en biotecnología vegetal, debido a que su genoma ha sido completamente secuenciado y a su papel en estudios sobre maduración de frutos, patogénesis y resistencia genética (Wang *et al.*, 2020).

1.1.2 Biología y patogénesis de *Candidatus Liberibacter* spp.

En 1994 el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (ICSB) actualmente denominado Comité Internacional de Sistemática Procariota (ICSP), acordó establecer una nueva categoría de organismos procariotas para organismos que no pueden ser clasificados de manera tradicional. Ante esta situación Murray y Stackebrandt, (1995) propusieron el término "*Candidatus*", para clasificar taxones procariotas, que no son susceptibles de ser aislados en cultivos axénicos y que son caracterizados por el análisis de su ADNr 16S. La ausencia de información sobre este tipo de bacterias hace difícil el desarrollo de estrategias que coadyuven el control de patógenos como los del género "*Liberibacter*" (Merfa *et al.*, 2019).

Los sistemas que permiten a las bacterias secretar proteínas conocidas como efectores dentro de las células del huésped se consideran entre los principales factores de virulencia de los patógenos bacterianos. Estas proteínas efectoras suelen inhibir las defensas de la planta o alterar sus procesos de desarrollo para favorecer la proliferación del patógeno. De manera interesante, las bacterias del género *Candidatus Liberibacter* poseen sistemas de secreción tipo I (T1SS) y una ruta secretora general completa (Sec) que emplea diversos mecanismos de patogénesis para infectar a sus hospedadores (Figura 1). *Ca Liberibacter* secreta efectores dependientes del sistema Sec-delivered effector (SDEs) y otros factores

de virulencia que interfieren con la expresión génica y las funciones proteica del hospedero, lo que conduce a necrosis de células del floema y disfunción de ese tejido conductor (Wang *et al.*, 2017). Estos efectores también interactúan con distintos organelos celulares, como plastidios, vacuolas, mitocondrias y el retículo endoplásmico, alterando funciones vitales del transporte celular. Además, la bacteria desencadena respuestas inmunitarias de la planta mediante Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) como los lipopolisacáridos, provocando muerte celular prematura y acumulación anormal de proteínas y calosa en el floema, lo que contribuye al desarrollo de síntomas severos en las plantas infectadas (Wang *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2021).

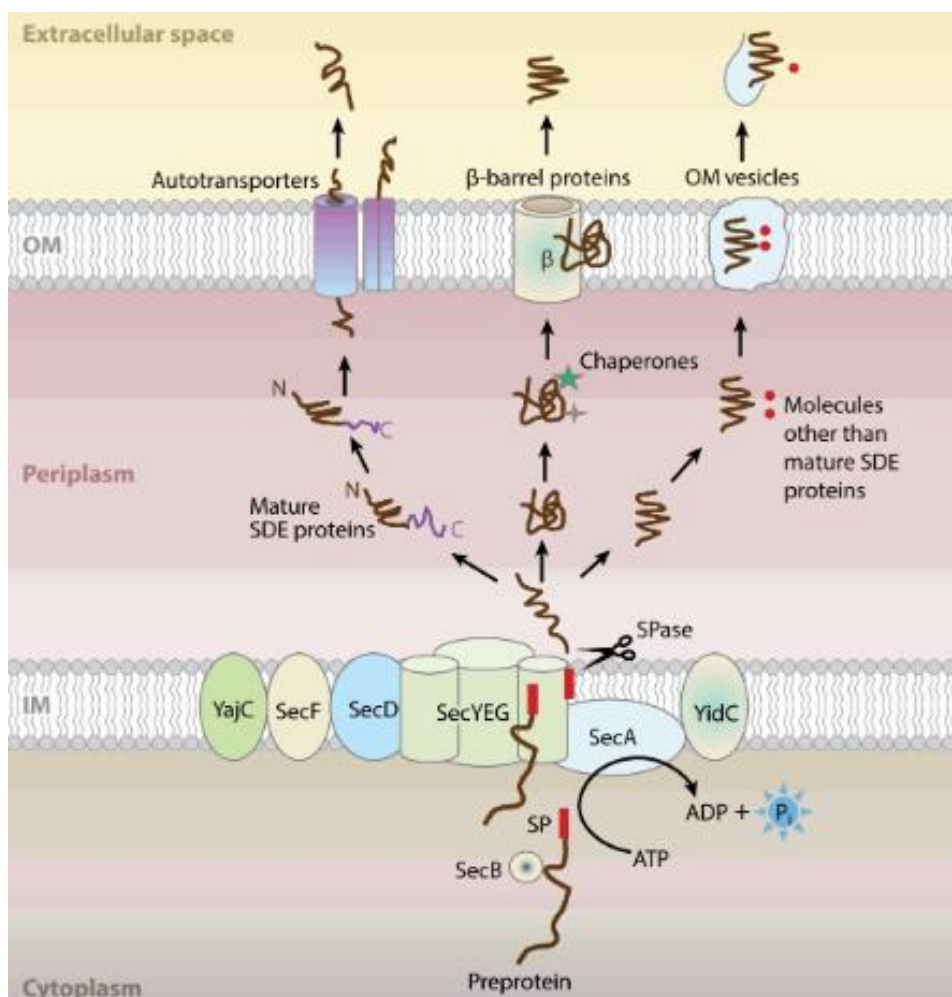


Figura 1. *Candidatus Liberibacter* spp. contiene componentes básicos de la maquinaria Sec.

Imagen tomada de Wang *et al.* (2017).

Se ha planteado que las proteínas efectoras dependientes del sistema Sec (SDE, en color marrón en la Figura 1) son transportadas a través de esta vía de secreción. En este proceso, la chaperona SecB guía a la preproteína hacia la ruta de translocación, interactuando con SecA. Una vez que SecA une a la preproteína, esta última se dirige a la membrana interna (IM), donde el complejo SecYEG forma un canal por el cual el polipéptido puede atravesar la IM y translocarse al espacio periplásmico. Para que la translocación continúe, es necesaria la hidrólisis de ATP como fuente de energía. Además, *Liberibacter* podría emplear mecanismos alternativos para exportar proteínas a través de su membrana externa (OM). Algunas proteínas con estructura de barril β presentes en esta membrana podrían haber adquirido la función de transportar proteínas hacia el exterior de la bacteria. Ciertas proteínas SDE funcionan como autotransportadores y otras podrían ser liberadas mediante vesículas derivadas de la membrana externa, como se ilustra en la Figura 1 (Wang *et al.*, 2017).

1.1.3 Especies de *Liberibacter*

Existen cuatro especies de importancia económica de *Candidatus Liberibacter* distribuidas mundialmente: *CaL asiaticus* (CaLas) la especie mayormente distribuida en cultivos de cítricos, presente principalmente en los continentes asiático, y americano, *CaL africanus* (CaLaf) distribuido en el continente africano y los países de medio oriente como: Arabia Saudita y Yemen, *CaL americanus* (CaLam) distribuida en Sudamérica, presente en Brasil y Paraguay, y por último, *CaL solanacearum* (CaLso) presente en campos de cultivo de solanáceas de Estados Unidos, México y Nueva Zelanda, con potencial migración hacia cultivos de solanáceas en todo el mundo (Munyanzeza *et al.*, 2007; SENASICA, 2019; Wan *et al.*, 2020). Las especies asiática y africana fueron identificadas en muestras de cítricos provenientes de India y de Sudáfrica respectivamente (Jagoueix *et al.*, 1994). La especie *Ca. L americanus* se reportó por primera vez en 2004 en cultivos de cítricos en 2004 del estado de Sao Paulo, Brasil (Texeira *et al.*, 2005). La especie de CaLso se detectó por primera vez en cultivos de papa en Estados Unidos y México y recientemente se ha encontrado también en tomate (Liefing *et al.*, 2009).

En Nueva Zelanda se reportó en muestras de tomate y posteriormente en papa y chile (Munyanzeza *et al.*, 2007; Liefting *et al.*, 2009).

1.2 Distribución geográfica y vectores

La bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. se encuentra distribuida en países de Asia, África, Oceanía y América (CABI, 2018; 2019; SENASICA, 2019). La distribución geográfica y los vectores de las especies de *Candidatus Liberibacter* se resumen en la Tabla 1 y Figura 2, respectivamente.

Tabla 1. Distribución geográfica y vectores de *Candidatus Liberibacter* spp.

Candidatus Liberibacter asiaticus		
Continente	Países con reportes	Vector
Asia	Bangladesh, Bután, Camboya, China (Fujian, Guangdong, Guangxi, Guizhou, Hainan, Hong Kong, Hunan, Jianxi, Sichuan, Yunnan, Zhejiang), India (Timor Oriental, Andhra Pradesh, Arunachal Pradesh, Assam, Bihar, Delhi, Gujarat, Haryana, Himachal Pradesh, Jammu y Kashmir, Karnataka, Kerala, Madhya Pradesh, Maharashtra, Manipur, Meghalaya, Mizoram, Nagaland, Orissa, Indian Punjab, Rajasthan, Sikkim, Tamil Nadu, Tripura, Uttar Pradesh, Uttarakhand, Bengal Occidental, Indonesia (Irian Jaya, Java, Kalimantan, Nusa Tenggara, Sulawesi, Sumatra), Irán, Japón, (Kyushu, Archipiélago de Ryukyu), Laos, Malasia (Malasia Peninsular, Sarawak), Myanmar, Nepal, Pakistán, Filipinas, Arabia Saudita, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, Vietnam y Yemen).	Diaphorina citri
África	Etiopia, Islas Mauricio y Reunión.	
Oceanía	Papúa Nueva Guinea	
América	México, Estados Unidos (Alabama, California, Florida, Georgia, Luisiana, Carolina del Sur y Texas), Barbados, Belice, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominica, República Dominicana, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Jamaica, Martinica, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Puerto Rico, Islas Vírgenes de Estados Unidos, Argentina, Brasil (Minas Gerais, Paraná, Sao Paulo) Colombia, Paraguay, Trinidad y Tobago, Venezuela.	
Candidatus Liberibacter africanus		
Continente	Países con reportes	Vector
Asia	Arabia Saudita, Yemen	

África	Burundi, Camerún, República Centroafricana, Comoras, Etiopía, Kenia, Madagascar, Malawi, Mauricio, Reunión, Ruanda, Santa Helena, Somalia, Sudáfrica, Suazilandia, Tanzania, Uganda, Zimbabue.	<i>Trioza erytrae</i>
Candidatus Liberibacter americanus		
Continente	Países con reportes	Vector
América	Brasil, Paraguay	<i>Diaphorina citri</i>
Candidatus Liberibacter solanacearum		
Continente	Países con reportes	Vector
América	Estados Unidos, México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua	<i>Bactericera cockerelli</i>
Europa	Alemania, España, Finlandia, Francia, Austria, Noruega, Suecia	
Asia	Marruecos	
Oceanía	Nueva Zelanda	

(SENASICA, 2019).

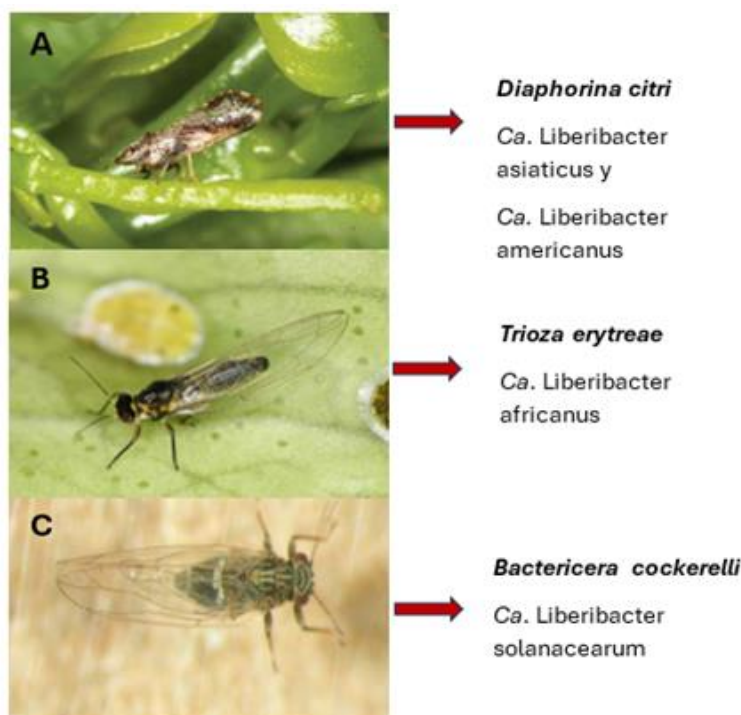


Figura 2. Vectores de las especies de *Candidatus Liberibacter*.

A) *Diaphorina citri* vector de la enfermedad del HLB. **B)** *Trioza erytrae* vector de la enfermedad del HLB. **C)** *Bactericera cockerelli* vector del Permanente del tomate y Zebra Chip en papa. Imagen tomada de Haapalainen (2014).

1.3 Enfermedades

El HLB, conocido también como “Dragon Amarillo” de los cítricos, es una enfermedad documentada en el sur de China a mediados del siglo XX. Esta enfermedad es considerada la más destructiva para los cítricos debido a su rápida propagación, el impacto negativo en la productividad y la susceptibilidad de todas las especies de cítricos. Es causada por las bacterias CaLas y CaLam las cuales son transmitidas por el psílido asiático *Diaphorina citri*, para la especie CaLaf el psílido africano *Trioza erytreae* es el mayor responsable de transmitir la enfermedad. Los síntomas incluyen manchas irregulares en las hojas, brotes atrofiados, muerte progresiva de las ramas y frutas más pequeñas con coloración deficiente (Bové, 2006; Wang y Trivedi, 2013; SENASICA, 2019).

En cuanto a las solanáceas, CaLso es el patógeno responsable de enfermedades como el "Permanente del Tomate" (PT), "Zebra Chip" (ZC) en papa, y “brotes cloróticos” (BC) en chile, transmitido por el insecto vector *Bactericera cockerelli*, que se alimenta del floema de diversas plantas, entre las que destacan tomate, papa y chile (Hansen *et al.*, 2008; Melgoza *et al.*, 2018). En 2009, se confirmó la presencia de esta bacteria en cultivos de tomate en Sinaloa (INTAGRI, 2017). En 2018, se identificó el insecto transmisor en 14 estados de México, y en San Luis Potosí se detectó en cultivos de jitomate y chile, causando graves pérdidas económicas en invernaderos y cultivos al aire libre, debido a la dificultad de controlar al vector y el impacto en la calidad y rendimiento de los frutos (El Sol de San Luis, 2019).

1.3.1 Epidemiología en México

El Huanglongbing (HLB) se ha convertido en una amenaza global para la industria citrícola, y los esfuerzos de investigación se centran en mejorar los métodos de detección que puedan incluso detectar plantas enfermas sin sintomatología, para un diagnóstico temprano, o en caso de presentar sintomatología corroborar el patógeno responsable de la enfermedad. El diagnóstico certero hace posible tratar adecuadamente a las plantas infectadas. Una de las estrategias de control es el desarrollo de plantas resistentes para reducir su diseminación (Texeira *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Dutt *et al.*, 2015).

En México, particularmente en el estado de Colima, se han perdido grandes áreas de cultivo de limón mexicano debido a la plaga del HLB. Esta enfermedad, conocida también como "dragón amarillo", llegó a Colima en 2010 y se propagó rápidamente, afectando gravemente la producción de limón. Se estima que alrededor de 5,000 hectáreas de cítricos fueron sustituidas, lo que resultó en una pérdida de más de 189,000 toneladas de producción de limón y un impacto económico estimado de 454 millones de pesos (Granados-Ramírez *et al.*, 2022).

1.4 Diagnóstico y detección

El diagnóstico basado en la sintomatología analiza los síntomas característicos que presentan las plantas afectadas. En el caso del HLB, los síntomas distintivos incluyen el amarillamiento de los brotes jóvenes, asimetría en las hojas, y la presencia de frutos deformados o con coloraciones anormales (Figura 3).

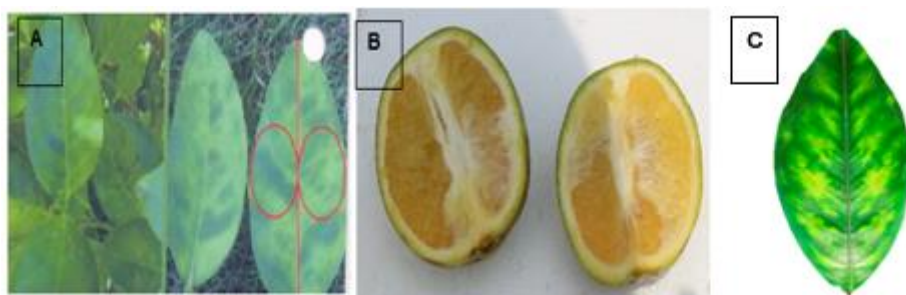


Figura 3. Sintomatología de la enfermedad del HLB en cítricos.

A) Hojas de cítricos, con asimetría y moteado en la parte adaxial. **B)** Crecimiento irregular del fruto. **C)** Deficiencia de Zinc que produce una clorosis simétrica. Imágenes tomadas en campo.

Un diagnóstico preliminar es el método del almidón-iodo para la detección del HLB. Este método se basa en la acumulación anormal de almidón en las hojas infectadas, que ocurre debido a la obstrucción del floema por la bacteria *Candidatus Liberibacter*, que bloquea el transporte de nutrientes. El proceso involucra la decoloración de las hojas con alcohol y luego su inmersión en una solución de yodo (lugol). Las áreas que contienen almidón se tiñen de azul oscuro, lo que sugiere una posible infección por HLB (Figura 4).

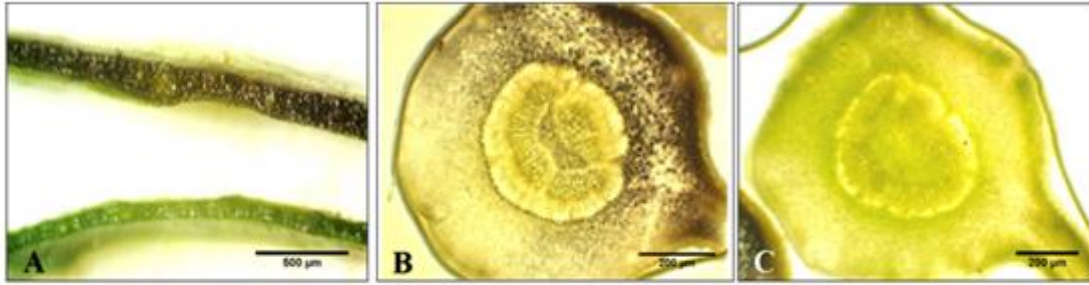


Figura 4. Comparación de tinción y coloración de cortes de hojas sanas e infectadas por HLB en cítricos por la prueba de almidón.

A) Parte superior: corte de hoja infectada (positivo) por HLB, coloración oscura, parte inferior: corte de hoja sana (negativo) sin HLB. **B)** Peciolo de hoja infectada (positivo) por HLB, coloración oscura. **C)** Peciolo de hoja sana (negativo) sin HLB. Imagen tomada de González Segnana *et al.* (2020).

Aunque es un método rápido y económico, el diagnóstico debe confirmarse con técnicas más precisas como los análisis moleculares que garanticen un diagnóstico adecuado, y de ese modo evitar la diseminación de la enfermedad a otros cultivos (Vera-Aguilar, 2014; González Segnana *et al.*, 2020). También la presencia del vector nos puede dar una idea del tipo de enfermedad que pueda presentarse en un cultivo determinado.

Entre las técnicas más precisas para detectar a la bacteria *Candidatus Liberibacter* se encuentran las técnicas de inmunodetección y las técnicas moleculares.

1.4.1 Técnicas de inmunodetección

El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), utiliza anticuerpos específicos que unen con alta afinidad proteínas de la bacteria. Esta técnica es efectiva para la detección rápida del patógeno en un gran número de muestras, aunque por lo general se considera menos específica y sensible que los métodos moleculares (Ding *et al.*, 2015).

La impresión de tejidos (tissue-printing) es una técnica sencilla y económica que identifica a la bacteria directamente en el tejido vegetal, donde los antígenos son transferidos a una membrana absorbente tratada con anticuerpos específicos para una determinada bacteria. El principio básico de la impresión de tejidos radica en

que los materiales celulares presentes en una superficie recién cortada pueden transferirse de manera sencilla mediante contacto directo con una superficie adhesiva o absorbente, sin que ocurra una difusión significativa. Esto permite dejar una impresión bioquímica y física que conserva información anatómica detallada. Además, la impresión inmunológica de tejidos puede mantener y exponer la distribución de proteínas específicas en tejidos de mayor tamaño, como secciones de frutas, semillas, tallos o incluso en hojas intactas (Ding *et al.*, 2015; Makam *et al.*, 2023). Ding *et al.* (2015), utilizaron un anticuerpo policlonal diseñado contra el antígeno OmpA para identificar la presencia y distribución de CaLas en tejidos de cítricos. OmpA es un dominio proteico conservado en la membrana externa de bacterias Gram-negativas y desempeña funciones clave en la adhesión a células huésped, estructura y estabilidad de la membrana externa, interacción con el sistema inmune del hospedero y transporte de moléculas (Ding *et al.*, 2015; Makam *et al.*, 2023).

1.5 Técnicas moleculares

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es comúnmente usada para detectar a *Candidatus Liberibacter* en plantas infectadas. Existen variantes como la PCR convencional y la PCR en tiempo real (qPCR), que permiten una detección precisa y cuantitativa del ADN bacteriano, con alta sensibilidad, incluso puede detectar el patógeno en muy pequeñas cantidades (pg) en los tejidos vegetales que incluso cuando la planta no muestre síntomas. El estudio realizado por Teixeira *et al.* (2005), describe una técnica de PCR que amplifica regiones del gen del ADNr 16S de las bacterias CaLas, CaLaf y CaLam, que causan el HLB en los cítricos. Por otra parte, el estudio realizado por Hansen *et al.* (2008), amplifica el espaciador intergénico 16S-23S para la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum*. Li *et al.* (2006), implementaron la qPCR para *Ca. Liberibacter* asociadas al HLB mediante sondas TaqMan. Esta técnica amplifica regiones específicas del gen ADNr 16S de las bacterias causantes del HLB. La cuantificación se basa en la fluorescencia generada por sondas de ADN, que se unen a un blanco en el ADN de doble hebra de *Candidatus Liberibacter*.

1.6 Métodos de control

Los métodos de control para *Candidatus Liberibacter* se enfocan en evitar que se disemine el vector que transmite la bacteria, así como en prácticas culturales apropiadas y el uso de agentes químicos y biológicos.

I) Físicos

Se enfocan en limitar la propagación de la bacteria. Las estrategias incluyen eliminar plantas infectadas, controlar los insectos vectores con trampas y mallas, desinfectar herramientas y equipos con calor o vapor, instalar barreras físicas para impedir el acceso de insectos, controlar malezas que sirven de refugio a los insectos vectores, y aplicar tratamientos térmicos para erradicar la bacteria sin dañar las plantas (Wang y Trivedi, 2013).

II) Químicos

Se han evaluado antibióticos como la oxitetraciclina, ampicilina y penicilina (Zhang *et al.*, 2014a), junto con nuevos compuestos como la "zhongshengmicina", que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, y la "validoxilamina A", que afecta el metabolismo de carbohidratos en la bacteria (Andrade *et al.*, 2020). También se investigan nanoemulsiones y péptidos antimicrobianos como alternativas sostenibles (Li *et al.*, 2021). Aunque los plaguicidas siguen utilizándose contra *Diaphorina citri*, actualmente se combinan con otros enfoques para reducir su impacto ambiental.

III) Biológicos

Se exploran estrategias avanzadas como el "mejoramiento híbrido", con variedades resistentes como *Poncirus trifoliata* (Stover *et al.*, 2015), y la "terapia microbiana", utilizando bacterias benéficas como *Pseudomonas* y *Bacillus* para competir con CaLas por nutrientes y estimular la defensa de las plantas a través de la Resistencia Sistémica Inducida (ISR). (Poveda *et al.*, 2021). También se han probado bacteriófagos para atacar patógenos de cultivos (Sharma *et al.*, 2023). En lo que respecta al control del vector *Diaphorina citri*, se utilizan depredadores naturales

como coccinélidos (*Olla v-nigrum*, *Harmonia axyridis*), crisopas y parasitoides como *Tamarixia radiata* (USDA, 2003).

Existen varias alternativas para combatir la bacteria *Candidatus Liberibacter*, combinando enfoques biotecnológicos y nutricionales que podrían ser mucho más eficientes que los métodos actualmente en uso (Makam et al., 2023).

1.7 Mecanismos de defensa en plantas

Las plantas, han desarrollado mecanismos de defensa altamente especializados para detectar y responder a diversos patógenos. Su sistema inmunológico se basa en una red de reconocimiento molecular y señalización hormonal que permite activar respuestas tanto locales como sistémicas ante el ataque microbiano. La primera línea de defensa de las plantas es conocida como inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Esta forma de defensa es activada cuando las células vegetales detectan estructuras microbianas altamente conservadas, como la flagelina, quitina o lipopolisacáridos, a través de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) ubicados en la membrana plasmática (Boller y He, 2009). De acuerdo con Jones y Dangl (2006), "la inmunidad vegetal comienza con el reconocimiento de patrones conservados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), lo que conduce a una amplia activación de defensas basales". Esta activación genera respuestas rápidas como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la síntesis de calosa, y la expresión de genes de defensa, que refuerzan física y bioquímicamente a las células e inhiben el avance del patógeno. Sin embargo, muchos patógenos han evolucionado mecanismos para suprimir esta inmunidad basal mediante la secreción de efectores, proteínas diseñadas para interferir con los procesos defensivos de la planta (Wang et al., 2017). Frente a esto, las plantas poseen una segunda capa de defensa conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI). Esta respuesta involucra proteínas de resistencia (R), que reconocen directa o indirectamente los efectores patógenos. Como consecuencia, se activa una respuesta hipersensible (HR), que implica la muerte celular localizada en el sitio de

infección para evitar la propagación del patógeno a otros tejidos de la planta (Jones y Dangl, 2006).

A nivel sistémico, las plantas desarrollan respuestas inmunes de largo alcance a través de dos rutas principales: la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR). La SAR se activa tras una infección local y depende del ácido salicílico (SA) como molécula señal. Durrant y Dong (2004) mencionan que "SAR se caracteriza por una expresión generalizada de genes PR y una mayor resistencia a infecciones subsecuentes". Esta respuesta confiere una protección de amplio espectro contra distintos tipos de patógenos durante días o incluso semanas. Por su parte, la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) se desencadena mediante la interacción con microorganismos benéficos del suelo, como algunas rizobacterias pero también por daño mecánico (Durrant y Dong, 2004). A diferencia de la SAR, la ISR depende de las vías de jasmonato (JA) y etileno (ET). Como señalan Pieterse *et al.* (2014), "la ISR no conlleva acumulación de PRs, pero condiciona a la planta para responder más rápidamente a futuros ataques". Este fenómeno de "preparación" se conoce como *priming*, en el que la planta entra en un estado de alerta inmunológica sin activar de modo directo una respuesta energéticamente costosa.

En conjunto, estos mecanismos muestran que la inmunidad vegetal es compleja, dinámica y altamente adaptativa, permitiendo a las plantas responder eficientemente a amenazas biológicas sin necesidad de un sistema inmune móvil. La combinación de detección molecular precisa (PAMPs/efectores) y la integración de señales hormonales (SA, JA, ET), forma la base de una defensa eficaz tanto local como sistémica (Durrant y Dong, 2004; Jones y Dangl, 2006; Boller y He, 2009; Pieterse *et al.* 2014).

1.8 Los genes de resistencia *npr1* y *rar1* como alternativa para la protección de cultivos

La sobreexpresión de genes que puedan conferir resistencia contra enfermedades ocasionadas por bacterias es un método de control que se ha estado explorando recientemente. El gen *npr1* (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes 1) en

Arabidopsis thaliana es reconocido como un regulador central de SAR, una forma de inmunidad que permite a las plantas defenderse eficazmente contra una gran variedad de patógenos. Este gen cumple funciones cardinales tanto en la percepción de señales inmunes como en la activación de respuestas moleculares específicas.

Cuando una planta es infectada por un patógeno, los niveles de ácido salicílico (SA) aumentan de manera significativa, esto promueve la activación de *npr1*. En este contexto, NPR1 actúa como sensor de esta molécula. De acuerdo con Backer *et al.* (2019), "tras la infección por un patógeno, los niveles de SA aumentan en la planta desencadenando respuestas de defensa".

Una vez activado por el SA, NPR1 se transloca al núcleo, donde cumple un papel fundamental como coactivador transcripcional. En el núcleo, *npr1* interactúa con factores de transcripción de la familia TGA, regulando la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune, como los genes PR (Relacionado con la Patogénesis). Además, otros reguladores como WRKY18 también cooperan con *npr1* en la modulación de genes de defensa (Vera-Aguilar, 2014).

A nivel estructural, *npr1* contiene repeticiones de anquirina, las cuales son similares a las encontradas en inhibidores de factores de transcripción en otros organismos. Esta característica sugiere su participación directa en la regulación de la expresión génica (Kuai *et al.*, 2015).

Estudios recientes han mostrado que *npr1* interactúa con ATG6, una proteína relacionada con el proceso de autofagia. Esta interacción tiene un efecto positivo en la acumulación nuclear de *npr1* y en su estabilidad proteica, lo que intensifica su capacidad de activar defensas (Kumar *et al.*, 2022).

Además de su rol en la señalización mediada por SA, *npr1* también está implicado en la regulación cruzada con otras vías hormonales, especialmente con la del ácido jasmónico (JA). Esta interacción permite a la planta priorizar y modular su respuesta inmune según el tipo de patógeno (Kumar *et al.*, 2022). NPR1 se establece como un nodo clave en la red de defensa vegetal, integrando señales hormonales y coordinando la expresión de genes que permiten a la planta montar una defensa efectiva y adaptativa frente a diversos patógenos.

El gen *rar1* (Required for Mla12 Resistance 1) en *Arabidopsis thaliana* cumple un papel esencial en la inmunidad vegetal, particularmente en la resistencia mediada por genes R, los cuales permiten a las plantas detectar y responder específicamente a patógenos invasores. En este sentido, "es un regulador clave en la inmunidad vegetal porque asegura la funcionalidad de los receptores NLRs (Nucleotide-binding and Leucine-rich Repeat) mediante su interacción con HSP90 (Heat Shock Protein 90) y SGT1 (Suppressor of G2 allele of Skp1). Su actividad es esencial para la percepción de patógenos y la activación de respuestas de defensa, lo que permite a *Arabidopsis thaliana* resistir infecciones de manera efectiva" (Muskett *et al.*, 2002; Tornero *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003).

RAR1 actúa como cofactor molecular en la vía de señalización de los receptores intracelulares NLRs, los cuales detectan efectores que buscan suprimir las defensas vegetales. Receptores como RPM1, RPS2 y RPS5 en *A. thaliana* son responsables de esta detección. Una vez activados, RAR1 colabora estrechamente con SGT1 y la chaperona HSP90 para estabilizar y ensamblar adecuadamente los NLRs, asegurando su funcionamiento óptimo (Tornero *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003). La activación de los NLRs desencadena respuestas de defensa como la respuesta hipersensible (HR), que consiste en la muerte celular localizada para impedir el avance del patógeno. Asimismo, se activan rutas relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ácido salicílico (SA) y otros compuestos que amplifican la inmunidad (Muskett *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista bioquímico, RAR1 es una proteína tipo CHORD (Cysteine- and Histidine-rich Domain protein), con dos dominios CHORD que le permiten unirse a HSP90, estabilizando así a los NLRs.

Finalmente, se ha demostrado que la ausencia o mal funcionamiento de RAR1 compromete la inmunidad de la planta, pues afecta negativamente la actividad de los NLRs, reduciendo su capacidad para resistir infecciones (Muskett *et al.*, 2002; Tornero *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003). Se considera una pieza esencial del sistema inmunológico vegetal, que permite respuestas inmunes rápidas, eficaces y específicas.

1.9 Métodos de clonación de genes de resistencia por técnicas de biología molecular

Las técnicas de clonación hacen posible la inserción de genes de resistencia en plantas u otros organismos, permitiendo su integración, transcripción y traducción dentro del organismo receptor. Esto capacita a la planta para sintetizar compuestos que antes no producía o para incrementar la producción de sustancias ya presentes, otorgándole así una característica benéfica. El desarrollo de la clonación molecular comenzó con el descubrimiento de las enzimas de restricción, que cortan el ADN en sitios específicos. Estas enzimas permiten fragmentar el ADN y unir los fragmentos a vectores, mediante la enzima ADN ligasa. Las enzimas de restricción generan extremos "cohesivos" o extremos "romos". La unión de fragmentos con extremos cohesivos es más eficiente, pero requiere compatibilidad entre las hebras de ADN. Aunque la ligación de extremos romos es más versátil, es menos eficiente. Es posible convertir un tipo de extremo en otro mediante enzimas. Estas técnicas de corte y unión siguen siendo ampliamente utilizadas y se conocen como clonación tradicional (Bertero *et al.*, 2017). La clonación tradicional implica múltiples etapas para lograr con éxito la inserción de una secuencia deseada, ya que se transfiere únicamente un fragmento de ADN desde un plásmido donante o un producto de PCR hacia un vector específico. Debido a esta complejidad, se han desarrollado técnicas más eficientes para agilizar el proceso de clonación génica, como los métodos Gateway por recombinación y la técnica Golden Gate. Este último método emplea una enzima de restricción tipo IIS, la ligasa T4, el ADN de interés, y el vector en una sola reacción. Cuando se necesitan clonar fragmentos de varios kilobases, Golden Gate resulta útil, ya que permite amplificar y ensamblar el gen en un solo paso (Engler y Marillonnet, 2014).

1.9.1 La tecnología Gateway, en la clonación de genes

La clonación Gateway es una técnica basada en la recombinación sitio-específica del bacteriófago lambda, que permite su integración en el cromosoma de *E. coli* (según el manual del sistema pBAD/Thio His TOPO), eliminando en gran medida la necesidad de emplear métodos tradicionales con ADN ligasas. Este método utiliza

la PCR para amplificar el ADN objetivo mediante oligonucleótidos diseñados con una secuencia CACC en el extremo 5' del oligonucleótido forward. Esta secuencia CACC facilita la inserción del fragmento en el vector de entrada pENTR/D-TOPO mediante una topoisomerasa, asegurando una clonación direccional. El resultado es un plásmido en el que el fragmento de interés queda flanqueado por las secuencias attL1 y attL2. Posteriormente, la inserción puede ser transferida a un vector de expresión mediante una reacción de recombinación LR (Figura 5) (Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Topoisomerase-mediated capture and Gateway recombination

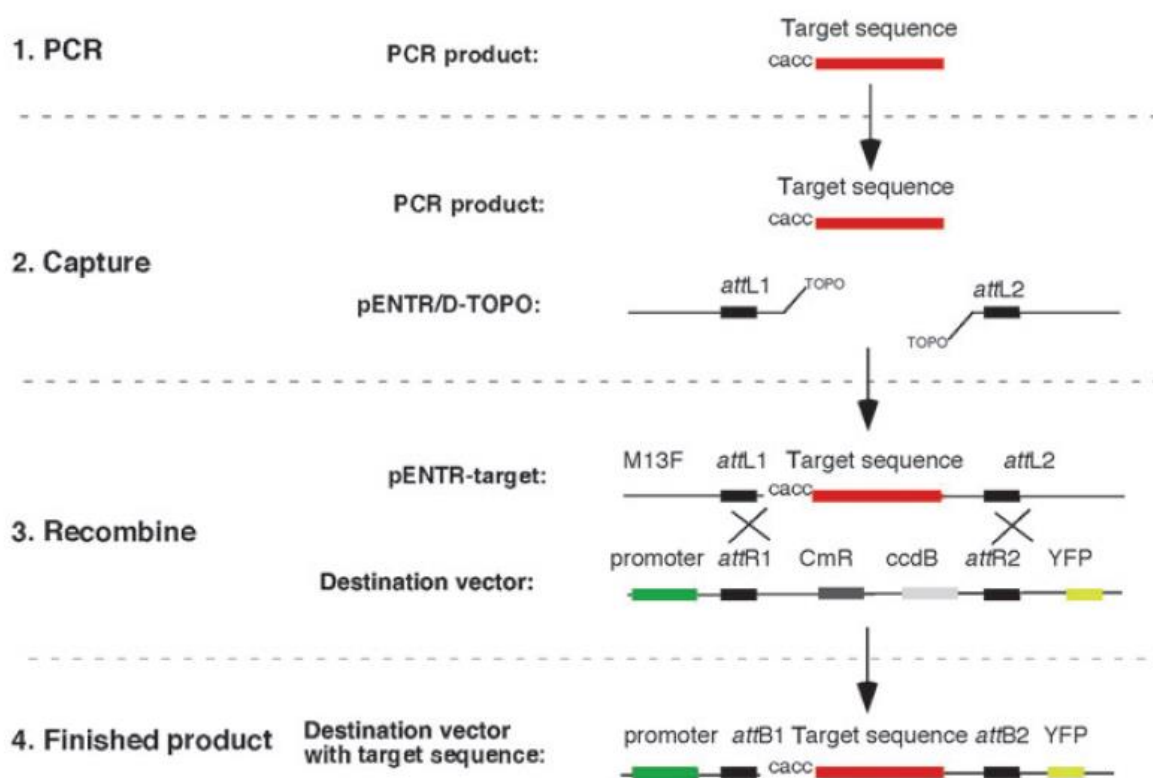


Figura 5. Ligación mediada por topoisomerasa y recombinación Gateway.

(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. Imagen tomada de Earley *et al.* (2006).

Esta tecnología fue desarrollada con el propósito de clonar fragmentos de ADN, ya sea de manera individual o múltiple y en una orientación específica, para estudiar la expresión génica en diversos sistemas. Entre sus principales ventajas se encuentran la eliminación de pasos como las digestiones enzimáticas, la capacidad de realizar recombinaciones reversibles, la ausencia de pérdida o adición de nucleótidos durante la transferencia, la opción de realizar múltiples inserciones simultáneas, la disponibilidad de distintos sitios de recombinación y la compatibilidad con varios vectores destino. Todo esto permite llevar a cabo un proceso de clonación rápido, eficiente y confiable, ideal para generar vectores binarios aptos para la transformación de plantas (Figura 6) mediante *Agrobacterium* (Earley *et al.*, 2006).

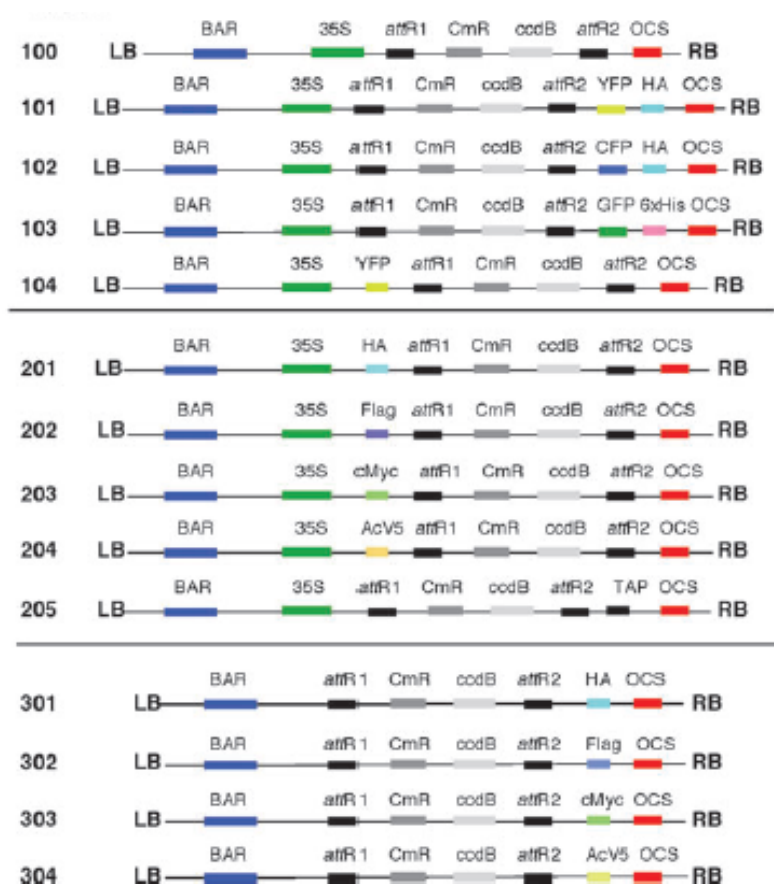


Figura 6. Vectores de transformación de plantas pEarleyGate.

Todos los plásmidos pEarleyGate son vectores binarios que pueden replicarse tanto en *Escherichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens* y contienen las secuencias de borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB) necesarias para la transferencia de ADN-T mediada por *Agrobacterium*. Imagen tomada de Earley *et al.* (2006).

1.9.2 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Se han empleado diversas técnicas para transformar plantas, aunque la más utilizada es la transformación mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Este método se basa en el uso de un plásmido bacteriano Ti (inductor de tumores), que contiene múltiples copias capaces de transferir información genética al genoma vegetal. Este plásmido puede modificarse fácilmente para insertar genes de interés entre las secuencias que delimitan el ADN-T, (borde izquierdo, LB y borde derecho, RB, respectivamente) que luego se introduce en *A. tumefaciens* (Soria-Guerra, 2007). Tras infectar las células vegetales, el ADN-T es escindido en sus bordes, transportado al núcleo e integrado aleatoriamente en el ADN cromosómico en uno o varios lugares. Durante el proceso de cultivo *in vitro*, las células que han sido transformadas se seleccionan y se regeneran hasta obtener plantas transgénicas (Figura 7).

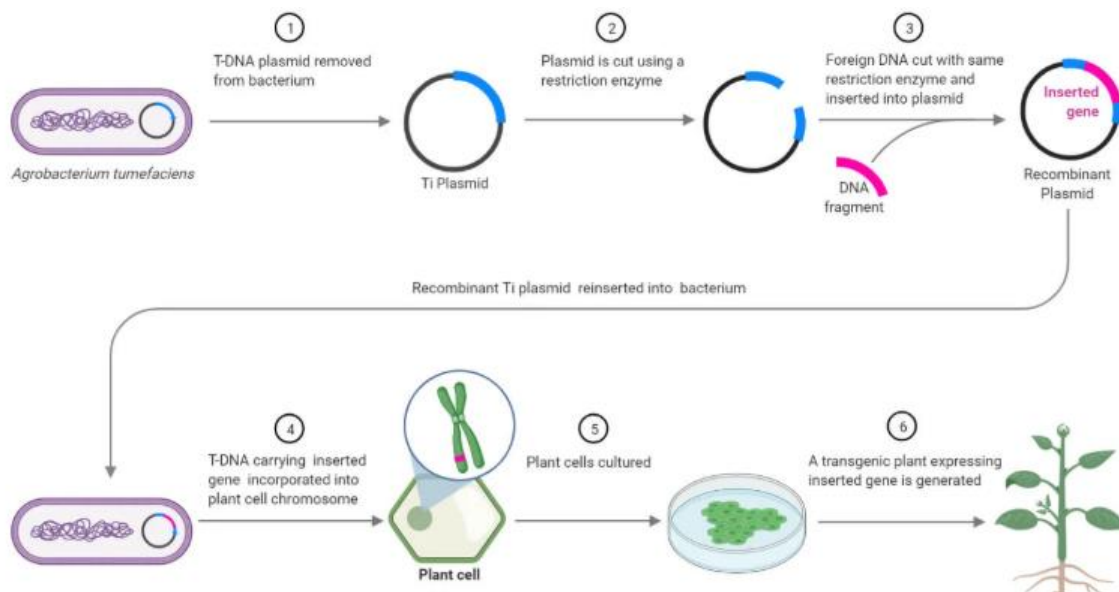


Figura 7. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tomado de Microbe Notes (2022).

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

Monitorear la presencia de *Candidatus Liberibacter* en cultivos de naranja (*Citrus sinensis*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) en San Luis Potosí, y obtener plantas transgénicas de tomate que sobreexpresen genes de resistencia contra el permanente de tomate.

2.2 Objetivos específicos

1. Monitorear la distribución de la bacteria *Candidatus Liberibacter* mediante detección y cuantificación por técnicas moleculares en cultivos de naranja y tomate en San Luis Potosí.
2. Generar controles positivos para las enfermedades del Huanglongbing y el Permanente del Tomate.
3. Demostrar que es posible clonar los genes de resistencia *rar1* y *npr1* mediante el sistema de clonación Gateway del ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*.
4. Demostrar que es posible transferir los genes de resistencia a las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación.
5. Demostrar que es posible transformar nuclearmente cotiledón e hipocótilo de plántulas de tomate mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.

III. Metodología

1.1 Muestreo en campos de cultivo de cítricos y tomate, en Cd. Fernández, Rioverde y Villa de Arista, S.L.P.

Se realizó un muestreo en tres predios de cultivos de cítricos en Cd. Fernández donde se tomaron 10 muestras de hojas de naranja y 2 muestras de hojas de limón, y un muestreo en un predio de Rioverde donde se obtuvieron 5 muestras de hojas de tomate (Tabla 2 y Figura 8). Adicionalmente, la Ing. Perla Medina nos proporcionó 4 muestras de hojas de tomate de un predio de Villa de Arista, S.L.P. Los síntomas distintivos para la enfermedad del HLB y la enfermedad del permanente del tomate (PT) incluyen clorosis, asimetría en las hojas, y la presencia de frutos deformados o con coloraciones anormales (Munyanza *et al.*, 2007; SENASICA, 2019).

Tabla 2. Ubicación de muestras de cítricos y tomate (*Solanum lycopersicum*) para el monitoreo de *Ca. Liberibacter* spp. por técnicas moleculares en SLP.

Muestras	Coordenadas	Municipio	Productor	Muestra	Comentarios
M1- árbol 1	21°57'22.3"N 100°04'45.4"W	Ciudad Fernández	Javier Hernández Rocha	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M2- árbol 2	21°57'22.3"N 100°04'45.4"W	Ciudad Fernández	Javier Hernández Rocha	Limón	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M3- árbol 3	21°57'22.3"N 100°04'45.4"W	Ciudad Fernández	Javier Hernández Rocha	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M4- árbol 4	21°57'22.3"N 100°04'45.4"W	Ciudad Fernández	Javier Hernández Rocha	Limón	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M5- árbol 5	21°57'22.3"N 100°04'45.4"W	Ciudad Fernández	Javier Hernández Rocha	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M6- árbol 1	21°54'15.5"N 100°01'24.9"W	Ciudad Fernández	Dr. José Antonio Castillo	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M7- árbol 2	21°54'15.5"N 100°01'24.9"W	Ciudad Fernández	Dr. José Antonio Castillo	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M8- árbol 3	21°54'15.5"N 100°01'24.9"W	Ciudad Fernández	Dr. José Antonio Castillo	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos

M9- árbol 1	21°56'57.7"N 100°03'44.8"W	Ciudad Fernández	Guadalupe Cabrera	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M10- árbol 2	21°56'57.7"N 100°03'44.8"W	Ciudad Fernández	Guadalupe Cabrera	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M11- árbol 3	21°56'57.7"N 100°03'44.8"W	Ciudad Fernández	Guadalupe Cabrera	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M12- árbol 4	21°56'57.7"N 100°03'44.8"W	Ciudad Fernández	Guadalupe Cabrera	Naranja / "Valencia"	Amarillamiento de hojas, maduración invertida de frutos
M13- planta 1	22°01'03.5"N 100°21'52.6"W	Rioverde	Ing. Eliseo Alonso Montoya	Tomate / SvTE 8444	Hojas con síntomas de permanente
M14- planta 2	22°01'03.5"N 100°21'52.6"W	Rioverde	Ing. Eliseo Alonso Montoya	Tomate / SvTE 8444	Hojas con síntomas de permanente
M15- planta 3	22°01'03.5"N 100°21'52.6"W	Rioverde	Ing. Eliseo Alonso Montoya	Tomate / SvTE 8444	Hojas con síntomas de permanente
M16- planta 4	22°01'03.5"N 100°21'52.6"W	Rioverde	Ing. Eliseo Alonso Montoya	Tomate / SvTE 8444	Hojas con síntomas de permanente
M17- planta 5	22°01'03.5"N 100°21'52.6"W	Rioverde	Ing. Eliseo Alonso Montoya	Tomate / SvTE 8444	Hojas con síntomas de permanente
M18- planta 1	-	Villa de Arista	Ing. Gustavo Reyna	Hojas de tomate	Hojas con síntomas de permanente
M19- planta 2	-	Villa de Arista	Ing. Gustavo Reyna	Tomate	Hojas con síntomas de permanente
M20- planta 3	-	Villa de Arista	Ing. Gustavo Reyna	Tomate	Hojas con síntomas de permanente
M21- planta 4	-	Villa de Arista	Ing. Gustavo Reyna	Tomate	Hojas con síntomas de permanente



Figura 8. Árbol de naranja mostrando síntomas de la enfermedad del HLB y planta de tomate mostrando síntomas de la enfermedad del Permanente del Tomate.

A) Árbol de naranja achaparrado con amarillamiento en hojas y asimetría en frutos.
B) Planta de tomate con deformación en las hojas y frutos con crecimientos irregulares.

3.2 Extracción de ADN genómico de muestras de cítricos y tomate colectadas en campo.

Se pesaron 0.5 g de hoja de las muestras colectadas en campo. Posteriormente, en un mortero, se agregó 1 mL de buffer de extracción que contiene Clorhidrato de Tris (Tris-HCl) 0.22 M, pH 8, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.022 M, pH 8, cloruro de sodio (NaCl) 0.8 M, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 0.8%, polivinilpirrolidona (PVP) 1%, N-lauroilsarcosina 1%, β -mercaptoetanol 0.2 %, D-sorbitol 0.14 M. Las hojas fueron maceradas con un pistilo en el buffer de extracción, y la mezcla resultante se colectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL; se colectaron 750 μ L del extracto. Las muestras se incubaron a 65°C durante 40 min y luego se centrifugaron, separando la fase acuosa que contiene el ADN. Esta fase se purificó en múltiples etapas mediante el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico para eliminar proteínas, lípidos y carbohidratos. Posteriormente, se eliminó el ARN con ARNasa, y el ADN fue precipitado con isopropanol. Se enfrió, centrifugó y se lavó

con etanol al 70%. Tras secarlo, se disolvió en agua Milli-Q. Finalmente, se midió la concentración y calidad del ADN por espectrofotometría en Nanodrop.

3.3 Detección por PCR de punto final para la amplificación del gen ADNr 16S de *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Liberibacter solanacearum*.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usa para detectar a *Candidatus* *Liberibacter* en plantas infectadas, por ser una técnica sensible y rápida. Se siguió el protocolo realizado por Texeira *et al.* (2005), para la amplificación de un fragmento del ADNr 16S de *Ca. Liberibacter asiaticus* y así monitorear la presencia de la bacteria en las muestras de cítricos obtenidas en campo. Las secuencias de los oligonucleótidos específicos utilizados para la detección de CaLas fueron: OL1 forward, 5'GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3', y el oligonucleótido reverso OL2c, 5'ATGGGTTGCGAAGTCGCGAGGC 3'. El programa utilizado para la PCR fue una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, 40 ciclos a una desnaturalización a 94 °C por 45 s, hibridación a 64 °C por 45 s, polimerización a 72 °C por 1 m y una polimerización final a 72 °C por 7 min (Texeira *et al.*, 2005). El ADN amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, mostrando un tamaño de 1,160 pb y se observó en un gel de agarosa al 1%. Por otra parte, para la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* se siguió el protocolo realizado por Hansen *et al.* (2008), que amplifica una región 16-23S de su genoma. Las secuencias de los oligonucleótidos específicos utilizados para la detección de CaLso fueron: LP Frag 4-(1611F) 5'GGTTGATGGGGTCATTTGAG 3', y LP Frag 4-480R 5'CACGGTACTGGTTCACTATCGGTC 3', con un ADN amplificado de un tamaño de 918 pb para CaLso. El programa utilizado para la PCR fue una desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, 35 ciclos a una desnaturalización a 98 °C por 10 s, hibridación a 60 °C por 30 s, polimerización a 72 °C por 1.30 s y una polimerización final a 72 °C por 10 min (Hansen *et al.*, 2008). El producto amplificado fue observado en un gel de agarosa al 1%. Esta técnica permite detectar la bacteria tanto en fases tempranas de la infección, como en una planta con síntomas. La detección en fases tempranas es crucial para un diagnóstico preciso antes de la aparición de síntomas.

3.2.1 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 por el método de CaCl₂.

Se inoculó una alícuota de la cepa TOP 10 en un tubo Falcón de 15 mL 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 preinóculo a un matraz con 50 mL de medio líquido LB (sin antibiótico) y se incubó a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ 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 agregó 7.7 mL de una solución fría de CaCl₂ 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 centrifugaron 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 CaCl₂ 0.1M con glicerol al 15%. Las células se distribuyeron en alícuotas de 50 µL en tubos Eppendorf fríos, que se congelaron luego en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.3 Cuantificación de la carga bacteriana de *Ca. Liberibacter asiaticus* por PCR en tiempo real en las muestras de cítricos colectadas en campo.

Para la cuantificación por qPCR de la carga bacteriana de CaLas en las muestras de cítricos colectadas en campo por qPCR, se siguió el protocolo de Li *et al.* (2006), que utiliza sondas TaqMan. Esta técnica amplifica regiones específicas del gen ADNr 16S de las bacterias causantes del HLB, utilizando los siguientes oligonucleótidos: HLBas Forward 5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3', HLBBr Reverse 5' CTACCTTTTTCTACGGGATAACGC 3' y la sonda HLBp 5' AGACGGGTGAGTAACGCG 3' (Li *et al.*, 2006).

3.4 Generación de controles positivos para la enfermedad del HLB de los cítricos y del Permanente del Tomate.

Se realizó la amplificación de una muestra donada por LANBAMA que se sabía era positiva para CaLas, y de una muestra colectada en campo que se sabía era positiva para CaLso. Las muestras amplificadas fueron purificadas por el Wizard® Genomic DNA Purification Kit y cuantificadas por espectrofotometría en Nanodrop. Posteriormente, se clonaron los fragmentos de ADNr 16S de las dos especies de *Ca. Liberibacter* en el vector pGEM®-T Easy (Figura 9). Una vez incubada la ligación en este vector, se transformó por choque térmico en células Top10 de *E. coli* calcio-competentes. Se corroboró que *E. coli* Top 10 tuviera el inserto de los fragmentos de ADNr 16S por PCR de colonia. Las colonias positivas por PCR fueron corroboradas por secuenciación de Sanger. Estos controles servirán para cada PCR de diagnóstico que se haga.

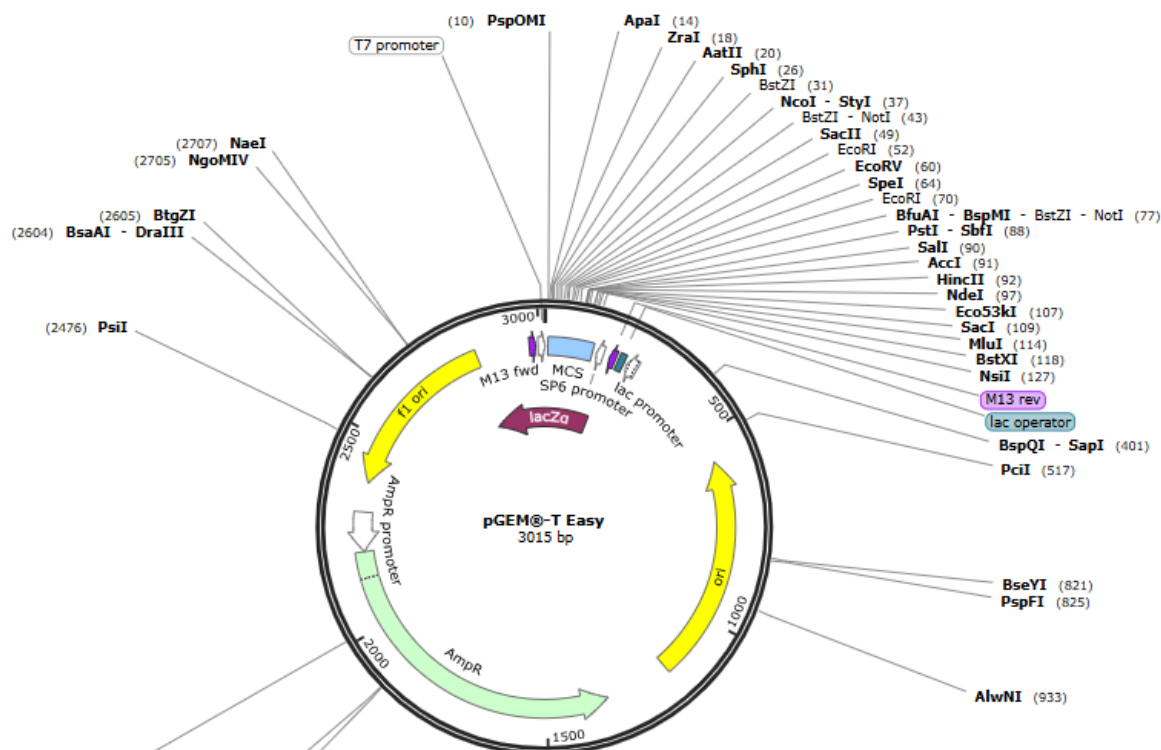


Figura 9. Vector de clonación pGEM®-T Easy. Imagen tomada de SnapGene <https://www.snapgene.com/>

3.5 Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* para la amplificación de los genes *rar1* y *npr1* y posterior clonación mediante el sistema Gateway.

3.5.1 Extracción de ADN genómico de *A. thaliana*.

El protocolo de extracción para tejidos vegetales de *A. thaliana* fue el mismo que el descrito anteriormente en la sección de “Extracción de ADN genómico de muestras de cítricos y tomate colectadas en campo” (Sección 3.2).

3.5.2 Amplificación de los genes *rar1* y *npr1* de *A. thaliana* para clonación mediante el sistema Gateway.

En el grupo de trabajo se contaba con oligonucleótidos específicos para los genes *rar1* (AT5G51700) y *npr1* (AT1G64280) de *A. thaliana*, que han mostrado conferir resistencia a los patógenos mencionados en otros cultivos. Se les agregó una secuencia adicional (CACC) en el oligonucleótido forward para ser introducido por recombinación direccional con la secuencia complementaria (GTGG) presente en el vector pENTR D-TOPO. En el laboratorio se cuenta con 4 pares de oligonucleótidos, que flanquean las regiones UTR 5' y 3' de los genes *rar1* y *npr1* de *A. thaliana* (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para amplificar los genes *rar1* y *npr1* de *Arabidopsis thaliana* con la secuencia CACC para pENTR D-TOPO del sistema Gateway.

Gen	Nombre	Oligos (5' a 3')	Región	Tm °C	Amplificación	Organismo
<i>rar1</i>	pERA1atF y R	F: CACCAATACTTTTTACTCCTACCT TCT R: GATCCAAAACACAGAAGATGAG	5' a 3' UTR	60° C	2,001 pb	<i>A thaliana</i>
<i>rar1</i>	pERA51atF y pERA32atR	F: CACCATGGAAGTAGGATCTGCAA C R: TATCAGACCGCCGGATCAG	Sin UTRs	60° C	1,775 pb	<i>A thaliana</i>
<i>npr1</i>	pENP1atF y pENP1atR	F: CACCGATGCTTCTTCATATCTCA C R: ACCTGCACATGTGGGAAGTTT	5' a 3' UTR	60° C	2,814 pb	<i>A thaliana</i>

<i>npr</i> 1	pENP51at F y pENP32at R	F: CACC ATGGACACCACCATTGAT R: ACGACGATGAGAGAGTTTACGGT TAG	Sin UTRs	60° C	2,077 pb	<i>A thaliana</i>
-----------------	----------------------------------	--	-------------	----------	----------	-------------------

El propósito de adicionar la región 5'UTR del gen a clonar se basa en reportes que indican que esta región puede dar mayor estabilidad al mRNA, lo que puede resultar en una mayor producción de la proteína, aunque no siempre sucede eso (Srivastava *et al.*, 2018). Posteriormente, se llevó a cabo una PCR de punto final para la amplificación de estos genes. Una vez amplificados, fueron purificados por el Wizard® Genomic DNA Purification Kit y cuantificados por espectrofotometría en Nanodrop. La ligación fue hecha en el vector de entrada pENTR D-TOPO (Figura 10) para una recombinación direccional. Una vez obtenida la ligación de los genes de *A thaliana* en el vector de entrada, se realizó la recombinación hacia el vector de expresión pEarleyGate 101 (Figura 11). Finalmente, se transformó *E. coli* Top10 con el vector pEarleyGate101 mediante choque térmico. Se corroboró que las células de *E. coli* transformadas tuvieran el gen de interés mediante PCR de colonia. Las colonias positivas por PCR fueron corroboradas por secuenciación de Sanger. Nos interesa clonar el gen con y sin 5' UTR para establecer diferencias en la expresión.

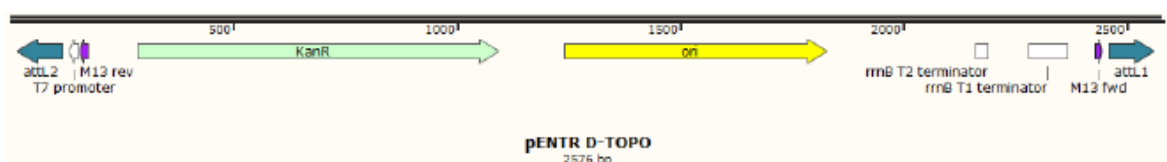


Figura 10. Vector de entrada pENTR D TOPO (Sistema Gateway).

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

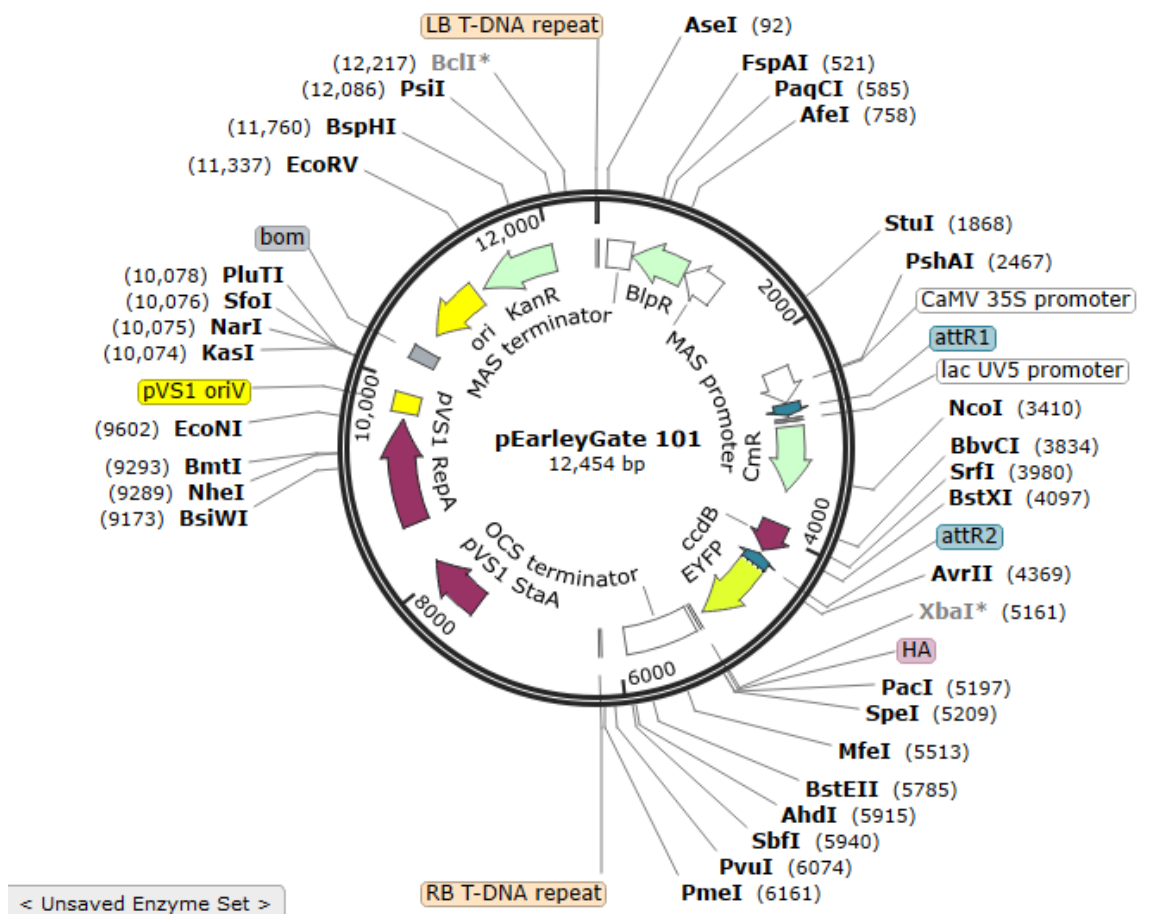


Figura 11. Vector de expresión pEarleyGate101 (Sistema Gateway).

Con las secuencias de borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB) necesarias para la transferencia de ADN-T mediada por *Agrobacterium*. Tomado de Earley *et al.* (2006).

3.6 Transformación nuclear de plantas de tomate mediante las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*.

3.6.1 Preparación de células electrocompetentes.

Las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* se inocularon en medio de cultivo LB por dos días a 28° C, de este preinóculo (DO₆₀₀. 0.04-0.08 a 600nm), se tomaron 5 mL y se añadió a 100 mL de medio LB y se incubó a 28° C hasta obtener una densidad óptica de 0.5, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4° C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min a 4°

C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol, previamente esterilizado. Se centrifugó y se resuspendieron las bacterias en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol, después de este lavado, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4° C, se resuspendió la pastilla en 400 µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50 µL y se almacenaron a -80°C (Soria-Guerra, 2007).

3.6.2 Electroporación de *Agrobacterium tumefaciens*

El plásmido pEarleyGate101 que contiene el gen de interés, fue introducido en las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Se colocó 1 µg del plásmido de interés sobre alícuotas de células electro-competentes. Se incubó en hielo por 2 min la mezcla de las mencionadas células y el plásmido de interés, y fueron luego transferidos a una cubeta de electroporación colocada sobre hielo. Los parámetros de electroporación fueron 25 µF, 400 Ω, y un pulso de 2.5 KV en un equipo Gene Pulser II.

3.6.3 Transformación nuclear de tomate mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*

Esterilización y germinación de semillas: se dejaron 10 min en hipoclorito de sodio (Cloralex) 50% y después se enjuagaron abundantemente (3-4 veces) con agua desionizada estéril. Se eliminó el exceso de agua pasando las semillas por papel Whatman estéril, después las semillas fueron puestas en frascos magentas con 35 mL de medio MS sólido. Las semillas fueron puestas a crecer durante 10 días en un cuarto de crecimiento a 25°C. Para la transformación de plantas de tomate se empleó el protocolo descrito por Rodríguez-González (2014), modificando el tipo de explante y agregando acetosiringona en el medio de co-cultivo. En resumen: se retiraron las radículas, y los cotiledones e hipocótilos se transfirieron a una suspensión de *Agrobacterium* (preparada en medio LB con kanamicina 100 mg/L, centrifugada y ajustada a DO600=0.2-0.5). Se le quitó el exceso de bacteria a los explantes y se colocaron en medio PM con acetosiringona 100 µM para inducir la

transferencia de ADN, se co-cultivó 2 días en oscuridad a 25 °C. Tras el co-cultivo, se transfirió a medio RM con carbón activado, ácido cítrico, cefotaxima (para eliminar *Agrobacterium*) y BASTA (para seleccionar tejidos transformados), bajo fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 25 °C, y se resebró cada 14 días. Las plántulas regeneradas (3-4 cm) se colocaron en medio RTM para inducir raíces, y tras un mes se transfieren a tierra estéril y luego al invernadero para su desarrollo adulto.

Se utilizó el sistema de co-cultivo de explantes vegetales con *A. tumefaciens*, en la Tabla 4 se indican los medios y sus componentes. En la Figura 12 se ilustra el procedimiento.

Tabla 4. Medios para cultivo *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Componentes	MS0 (Infección)	PM (Medio cocultivo)	RM (Medio de selección)	RTM (Medio de enraizamiento)
Sales Murashige y Skoog (MS)	10 mL de cada sal	10 mL de cada sal	10 mL de cada sal	10 mL de cada sal
Vitaminas MS	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Bencil aminopurina (BA)	-	1 mg/L	-	-
Ácido naftalenacético (ANA)	-	1 mg/L	-	-
Ácido indolacético (IAA)	-	-	0.5 mg/L	1 mg/L
Zeatina	-	-	1 mg/L	-
Tiamina	-	-	0.1 mg/L	-
Sacarosa g/L	30	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Fitigel g/L	2.5	2.5	2.5	2.5
Cefatoxima	-	-	250 mg/L	250 mg/L
Kanamicina	-	-	100 mg/L	100 mg/L
Glufosinato de amonio (BASTA)	-	-	0.75 mg/L	0.50 mg/L
Carbón activado g/L	-	-	3	1.5
Ácido cítrico mg/L	-	25	25	-
Acetosiringona	100 µM de stock a (100 mM) 1mL	100 µM de stock a (100 mM) 1mL	-	-

*Aforar a 1L con agua destilada estéril.

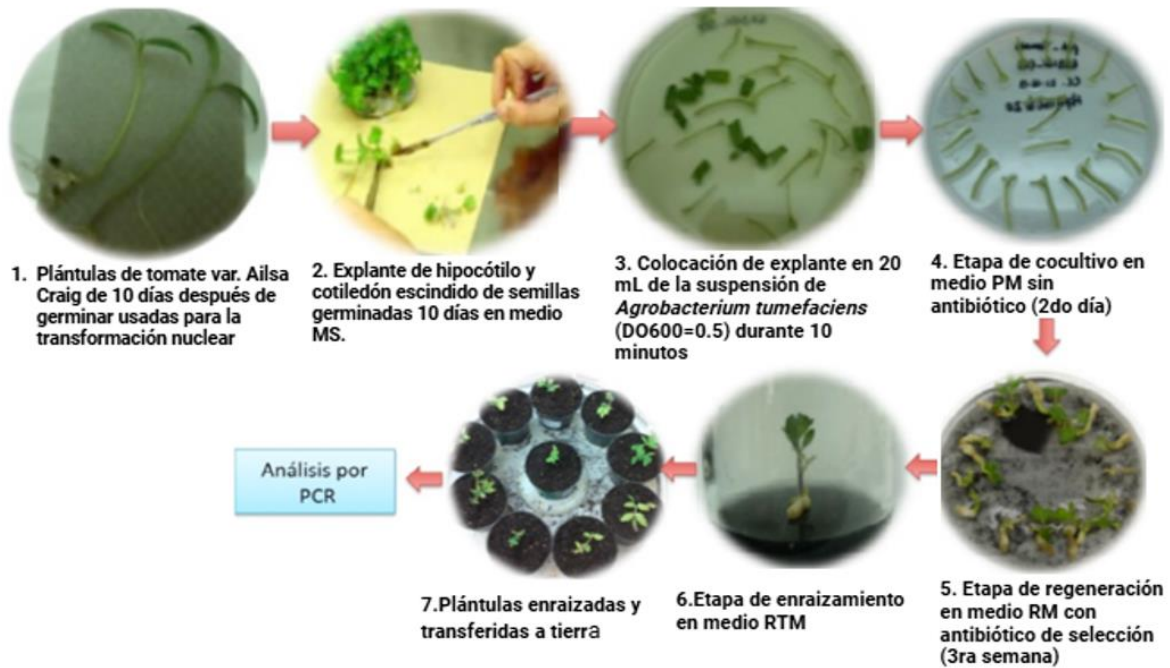


Figura 12. Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium* y regeneración de plantas de tomate.
Tomado de Rodríguez-González (2014).

IV. Resultados

4.1. Cuantificación por espectrofotometría en Nanodrop

Los resultados de la cuantificación por espectrofotometría de las muestras de cítricos y tomate colectadas en los municipios de Ciudad Fernández, Rioverde y Villa de Arista, San Luis Potosí, se resumen en la Tabla 5. Los resultados indican que las muestras tienen entre 33 y 633 ng/μL.

Tabla 5. Cuantificación de ADN por espectrofotometría en Nanodrop de las muestras colectadas en campo.

Muestras	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
M1- árbol 1	71 ng/μL	1.39	0.50
M2- árbol 2	121 ng/μL	1.35	0.51
M3- árbol 3	128 ng/μL	1.40	0.54
M4- árbol 4	58 ng/μL	1.35	0.50
M5- árbol 5	82 ng/μL	1.20	0.40
M6- árbol 1	70 ng/μL	0.84	0.35
M7- árbol 2	55 ng/μL	1.30	0.20
M8- árbol 3	67 ng/μL	1.54	0.26
M9- árbol 1	42 ng/μL	1.70	0.70
M10- árbol 2	33 ng/μL	0.70	0.20
M11- árbol 3	39 ng/μL	1.77	0.25
M12- árbol 4	56 ng/μL	1.34	0.38
M13-planta 1	230 ng/μL	1.54	0.74
M14-planta 2	260 ng/μL	1.46	0.61
M15-planta 3	633 ng/μL	1.61	0.67
M16-planta 4	254 ng/μL	1.42	0.64
M17-planta 5	330 ng/μL	1.53	0.70
M18-planta 1	192 ng/μL	1.60	0.88
M19-planta 2	142 ng/μL	1.36	0.54
M20-planta 3	307 ng/μL	1.26	0.47
M21-planta 4	125 ng/μL	1.55	0.75

4.1.2 Detección por PCR de *Ca. Liberibacter asiaticus* para la enfermedad del HLB en cultivos de cítricos.

De las 12 muestras colectadas en Cd. Fernández y Rioverde, SLP (M1 a M12 ver Tabla 5), solamente 3 muestras dieron positivas por PCR punto final para la enfermedad del HLB (Figura 13). Es necesario monitorear la presencia de la bacteria, por técnicas moleculares más sensibles como la PCR en tiempo real.



Figura 13. Detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* mediante PCR.

Gel de agarosa 1% que muestra los amplicones obtenidos de 1,160 pb por PCR de punto final. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carriles 2 – 13: muestras de hojas de cítricos (M1 a M12). Carril 14: Control de reactivos. Carril 15: Control (+).

4.1.2 Detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* para la enfermedad del Permanente en cultivos de tomate.

De las 9 muestras analizadas (M13 a M21 ver Tabla 5), 3 muestras fueron positivas para la enfermedad del PT. Las 5 muestras de Rioverde están en los carriles 2 al carril 6. Las 4 muestras del municipio de Villa de Arista se muestran del carril 7 al carril 10 (Figura 14). Es necesario monitorear la presencia de la bacteria, por técnicas moleculares más sensibles como PCR en tiempo real ya que observamos síntomas.

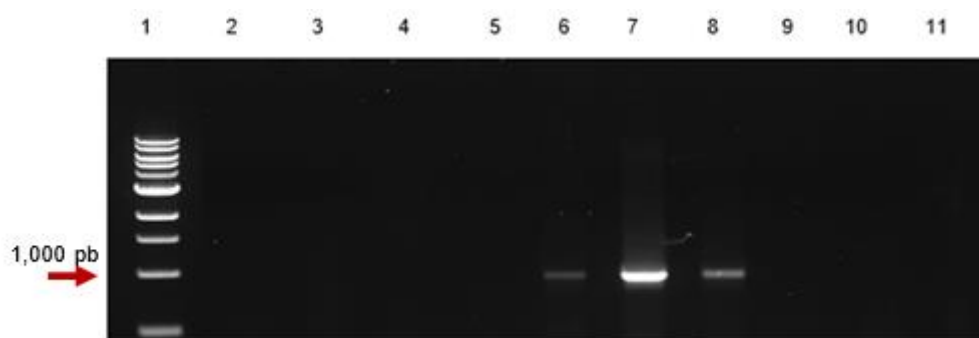


Figura 14. Detección de *Ca Liberibacter solanacearum* mediante PCR.

Gel de agarosa 1% que muestra los amplicones obtenidos de 918 pb por PCR de punto final. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carriles 2 -6: muestras de hoja de tomate de Rioverde (M13 a M17). Carril 7-10: muestras de hoja de tomate de Villa de Arista (M18 a M21). Carril 11: Control de reactivos. En esta etapa no se contaba con control positivo.

4.2 Cuantificación de la carga bacteriana de *Ca. Liberibacter asiaticus* por PCR en tiempo real en las muestras de cítricos colectadas en campo.

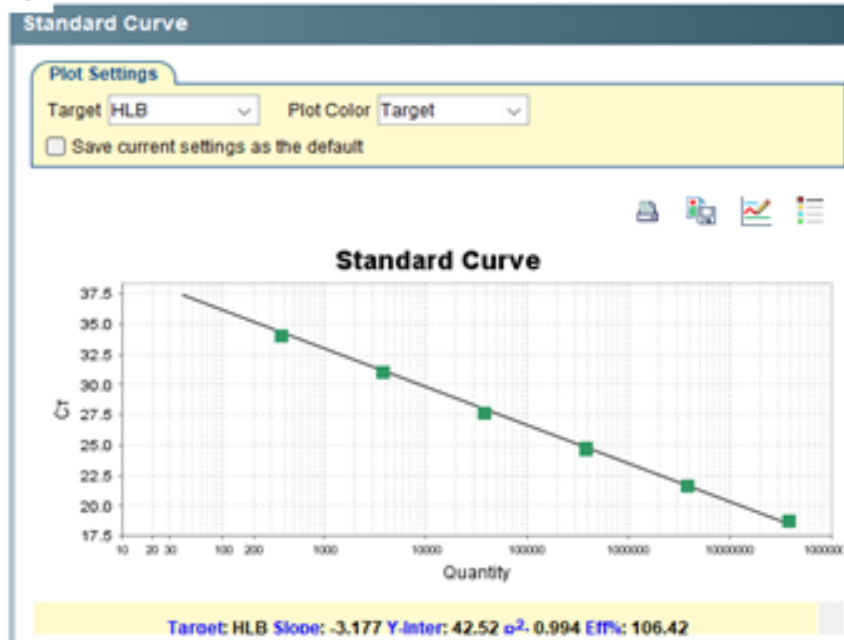
Para la cuantificación de la carga bacteriana de CaLas en las muestras de cítricos colectadas en campo se siguió el protocolo de Li *et al.* (2006), mediante sondas TaqMan. La Tabla 6 muestra las concentraciones en número de copias de la bacteria en las muestras tomadas de plantas con síntomas. Esta técnica amplifica regiones específicas del gen del ADNr 16S de las bacterias causantes del HLB. Se realizó una curva estándar de cuantificación con un plásmido con una concentración conocida que alberga el inserto de un fragmento de ADNr 16S de HLB. Se obtuvo una R de 0.99 y una pendiente de -3.18, lo cual es útil para validar nuestros resultados (Figura 15).

Tabla 6. Resultados obtenidos de las muestras de cítricos.

Patógeno analizado: <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>				
Muestras		Resultado	Ct	Número de copias
M1- árbol 1	1er sitio de muestreo	Positivo	28.01	3.7×10^4
M2- árbol 2		Positivo	30.26	7.22×10^3
M3- árbol 3		Positivo	36.2	97.31
M4- árbol 4		Positivo	31.88	2.24×10^3
M5- árbol 5		Positivo	35.09	217.52
M6- árbol 1	2do sitio de muestreo	Positivo	35.01	231.83
M7- árbol 2		Positivo	35.59	152.11
M8- árbol 3		Positivo	35.19	203.46
M9- árbol 1	3er sitio de muestreo	Positivo	32.19	1.79×10^3
M10- árbol 2		Positivo	31.39	3.19×10^3
M11- árbol 3		Positivo	28.03	3.64×10^4
M12- árbol 4		Positivo	29.72	1.07×10^4

El valor de Ct refleja el ciclo en el que el nivel de fluorescencia supera el umbral e indica la cantidad de ADN presente en la muestra. Las muestras que tienen una mayor carga dieron positivo por PCR convencional. Los resultados indican que las muestras tienen entre 3.7×10^4 y 97.31 copias.

A)



B)

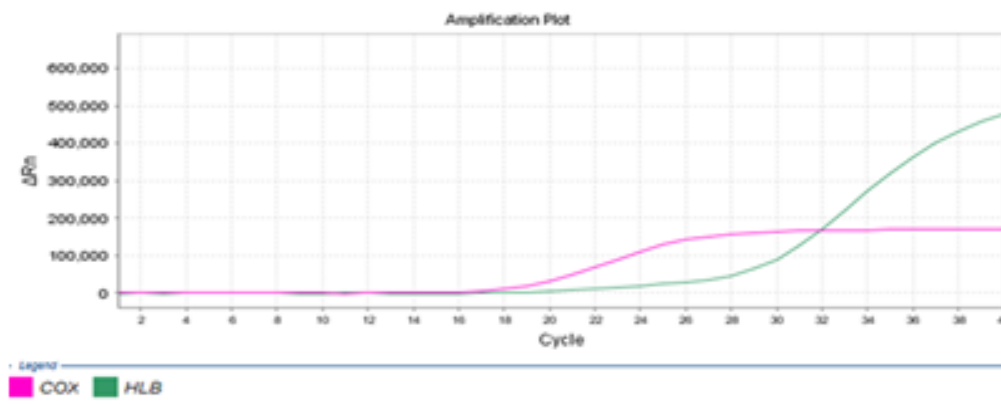


Figura 15. PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga bacteriana de CaLas.

A) Curva estándar de cuantificación generada por el software. **B)** Línea de amplificación del gen de interés en color verde (HLB), línea rosa, amplificación del gen del citocromo oxidasa vegetal (COX) como control interno para evaluar la calidad de la extracción de ADN. Se detectan Unidades Relativas de Fluorescencia arriba de un umbral. Equipo Applied Biosystem 7500 Fast utilizado para la cuantificación.

4.3 Generación de controles positivos para la detección de las enfermedades ocasionadas por las especies de *Ca. Liberibacter*.

Una vez incubada la ligación del producto de PCR de los fragmentos de *Ca. Liberibacter*, en el vector pGEM®-T Easy, se transformó por choque térmico en células Top10 de *E. coli* calcio-competentes. Se realizó una PCR de colonia con los oligonucleótidos específicos para el ADNr 16S de las dos especies de *Ca. Liberibacter* (Figura 16). Las colonias positivas fueron corroboradas por secuenciación de Sanger.

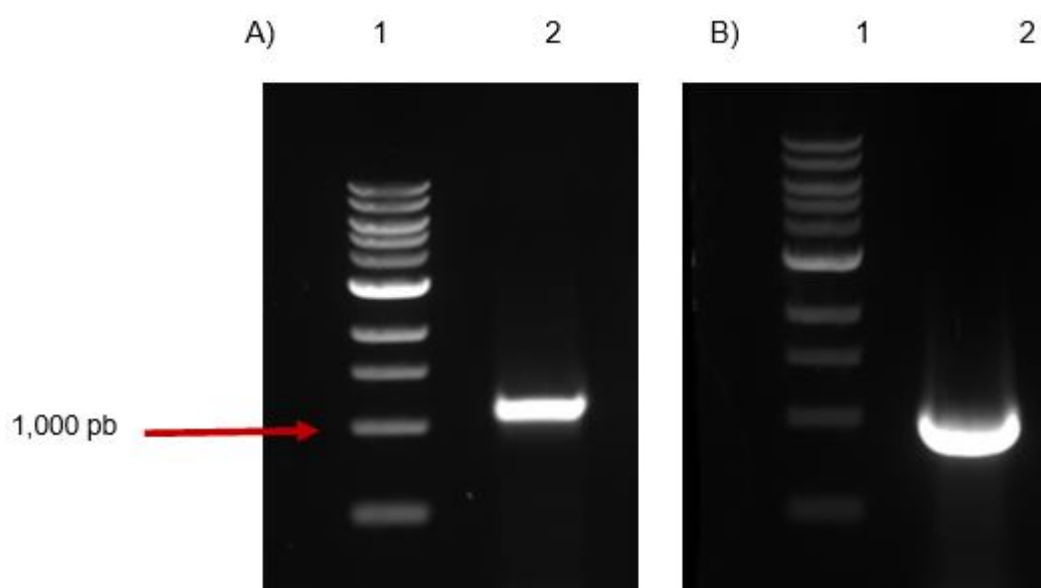


Figura 16. Verificación del fragmento de ADNr 16S de las especies de *Ca. Liberibacter* en pGEM®-T Easy, por PCR de colonia.

A) Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carril 2: Amplificación de 1,160 pb con los oligonucleótidos específicos para el gen ADNr 16S de *CaLas* (Texeira *et al.*, 2005). **B)** Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carril 2: Amplificación de 918 pb con los oligonucleótidos específicos para el gen ADNr 16S de *CaLso* (Hansen *et al.*, 2008).

4.4 Clonación del gen *rar1* sin UTR de *Arabidopsis thaliana* con el sistema de clonación Gateway.

Se utilizó el vector de entrada pENTR-D TOPO (Thermo Fisher Scientific, Cat. K240020) del sistema de clonación Gateway. Este vector linealizado incluye el promotor T7 en el extremo 3' del sitio de clonación, el terminador *rrnB* T2, y las secuencias de recombinación attL1 y attL2, que permiten transferir la inserción hacia cualquier vector de expresión Gateway mediante la recombinación LR (ver Figura 5). En el sitio attL1 se encuentra una secuencia cohesiva GTGG, en la cual se insertó de forma direccional la secuencia genómica de *rar1*, incluyendo sus regiones UTR (sección 4.4.1), proveniente de *Arabidopsis thaliana*. Esto fue posible al añadir una secuencia CACC en el extremo 5' del oligonucleótido forward.

Una vez obtenida la ligación de los genes de *A. thaliana* en el vector de entrada se transformó *E. coli* Top10 con el vector pENTR-D TOPO mediante choque térmico. Se corroboró que *E. coli* Top10 tuviera el gen de interés mediante PCR de colonia (Figura 17).

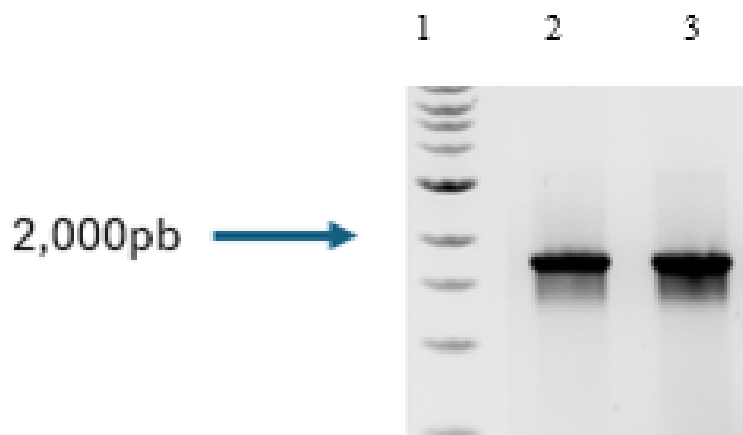


Figura 17. Verificación del del gen *rar1* sin UTR en pENTR D-TOPO por PCR de colonia.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs.

Carril 2 y 3: Amplificación con los oligonucleótidos específicos para el gen *rar1*.

Las colonias positivas por PCR fueron corroboradas por restricción enzimática y posterior secuenciación de Sanger (Figuras 18 y 19 respectivamente). Se obtuvo la construcción pENTR-D TOPO + *rar1* sin UTR (Figura 20).

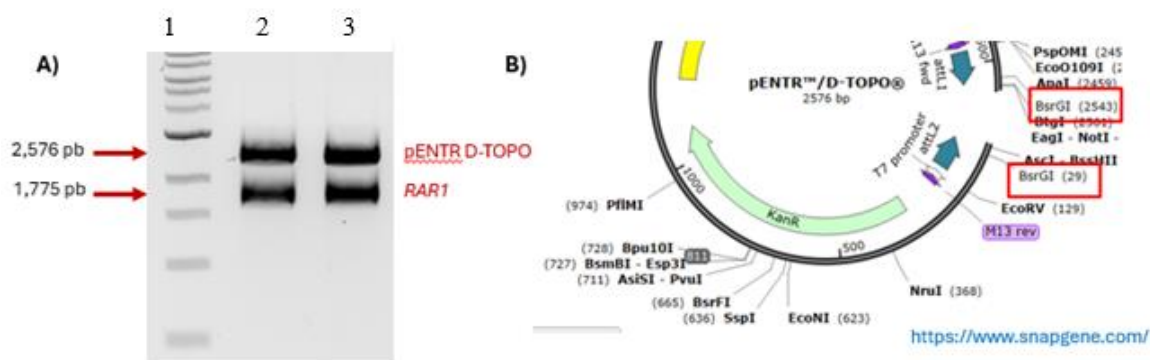


Figura 18. Verificación del fragmento del gen *rar1* sin UTR en pENTR D-TOPO por restricción enzimática.

A) Comprobación de la construcción pENTR D-TOPO y *rar1* sin UTR por medio de restricción con *BsrGI*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carril 2 y 3: Verificación del gen *rar1* sin UTR (1,775 pb) y el vector de entrada pENTR D-TOPO (2,576 pb). **B)** La enzima *BsrGI* corta en los sitios de recombinación attL1 y attL2 liberando el fragmento del vector y el fragmento del inserto.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone MIO24	Arabidopsis tha...	1677	1797	81%	0.0	99.11%	86212	AB010074.2
✓	Arabidopsis thaliana cysteine and histidine-rich domain-containing protein RAR1 (PBS2). mRNA	Arabidopsis tha...	1574	1694	74%	0.0	99.51%	1764	NM_001344954.1

Figura 19. Blastn de la secuencia obtenida por secuenciación.

Las dos primeras secuencias corresponden a la secuencia de interés reportada en TAIR (AT5G51700).

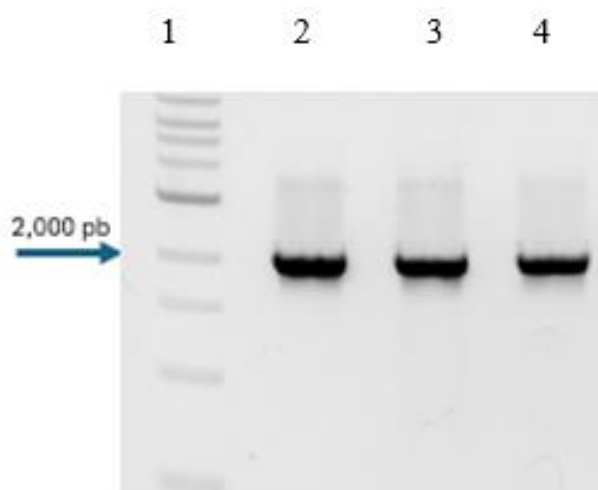


Figura 21. Verificación del gen *rar1* con UTR en pENTR D-TOPO por PCR de colonia.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs.

Carril 2, 3 y 4: Amplificación con los oligonucleótidos específicos para el gen *rar1*.

Las colonias positivas por PCR fueron corroboradas por restricción enzimática y posterior secuenciación de Sanger (Figuras 22 y 23 respectivamente). Se obtuvo la construcción pENTR-D TOPO + *rar1* UTR (Figura 24).

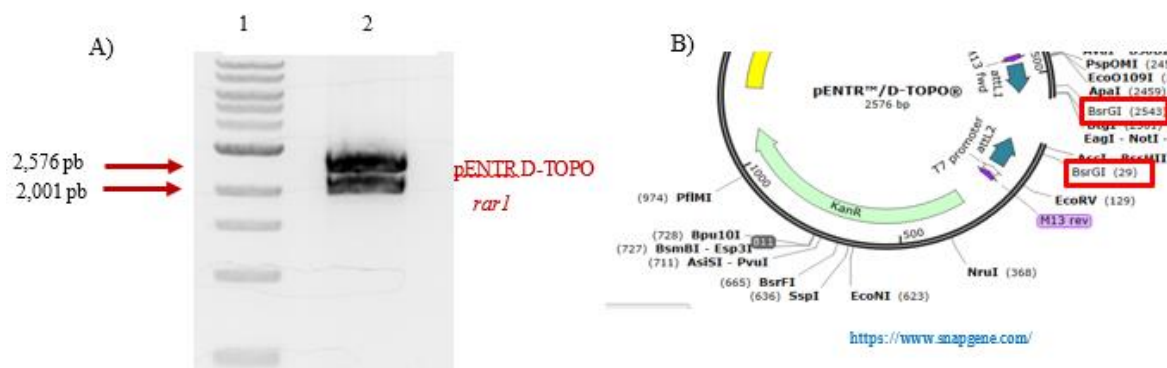


Figura 22. Verificación del gen *rar1* UTR en pENTR D-TOPO por restricción enzimática.

A) Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carril 2: Verificación del gen *rar1* UTR (2,001 pb) y el vector de entrada pENTR D-TOPO (2,576 pb) después de la digestión con *BsrG1*. **B)** La enzima *BsrG1* corta en los sitios de recombinación attL1 y attL2 liberando el fragmento del vector y el fragmento del inserto.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Arabidopsis thaliana genomic DNA_chromosome 5_P1 clone.MIO24	Arabidopsis tha...	1799	1911	88%	0.0	98.20%	86212	AB010074.2
✓	Arabidopsis thaliana cysteine and histidine-rich domain-containing protein RAR1(PBS2)_mRNA	Arabidopsis tha...	1676	1788	78%	0.0	98.99%	1764	NM_001344954.1

Figura 23. Blastn de la secuencia obtenida por secuenciación.

Las dos primeras secuencias corresponden a la secuencia de interés reportada en TAIR (AT5G51700).

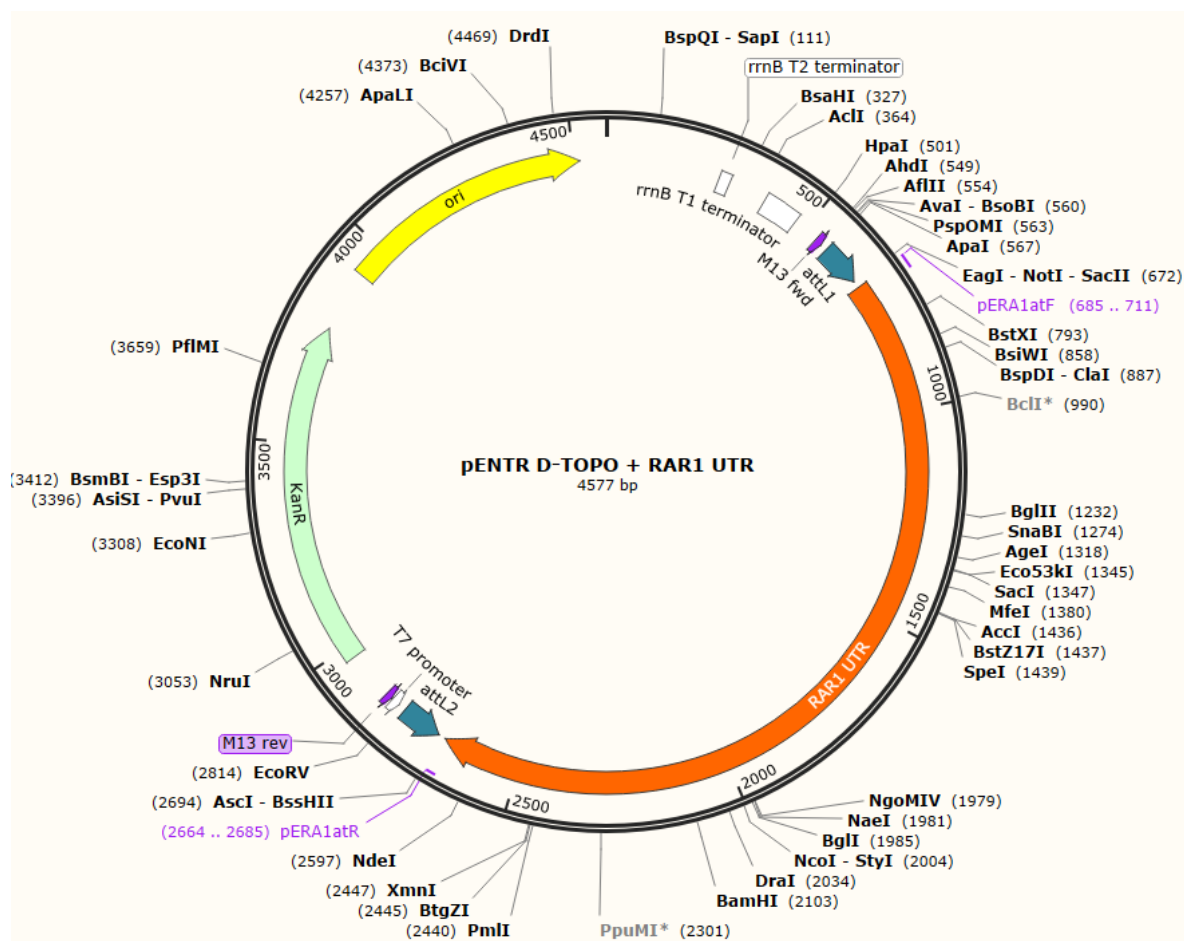


Figura 24. Obtención de la construcción pENTR-D TOPO + *rar1* UTR en el vector de entrada del sistema Gateway.

4.4.2 Generación de dos construcciones que albergan el gen *rar1* sin UTR y con UTR de *A. thaliana* mediante el sistema de clonación Gateway.

Una vez obtenida la ligación de los genes *rar1* sin UTR y con UTR de *A. thaliana* en el vector de entrada (pENTR-D TOPO), se realizó la recombinación hacia el vector de expresión (pEarleyGate 101). Finalmente, se transformó *E. coli* Top10 con el vector pEarleyGate101 mediante choque térmico. Se corroboró que *E. coli* Top10 tuviera el gen de interés mediante PCR de colonia (Figura 25). Se obtuvieron dos construcciones pEarleyGate 101 + *rar1* sin UTR y pEarleyGate 101 + *rar1* UTR (Figuras 26 y 27), listas para transferir a las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*.

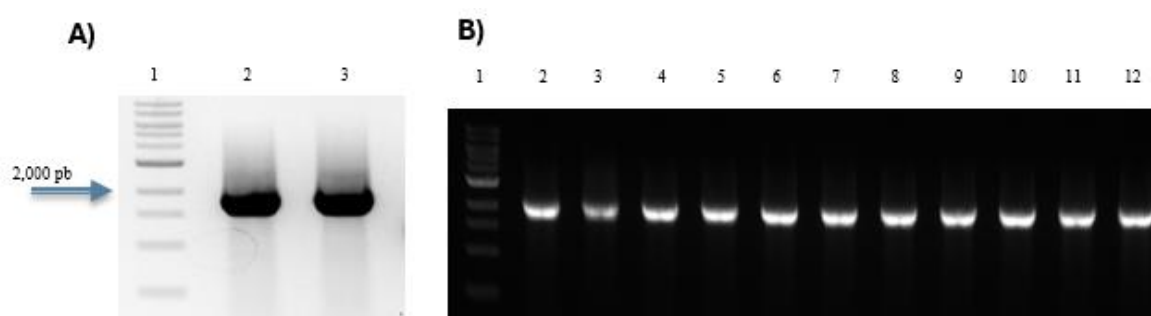


Figura 25. Verificación del gen *rar1* en pEarleyGate101 por PCR de colonia. A) *rar1* sin UTR.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carriles 2 y 3: Amplificación con los oligonucleótidos pERA51atF y pERA32atR para el inserto de 1,775 pb, de las colonias transformantes. **B) *rar1* UTR.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carriles 2 – 12: Amplificación con los oligonucleótidos pERA1atF y pERA1atR para el inserto de 2,001 pb, de las colonias transformantes.

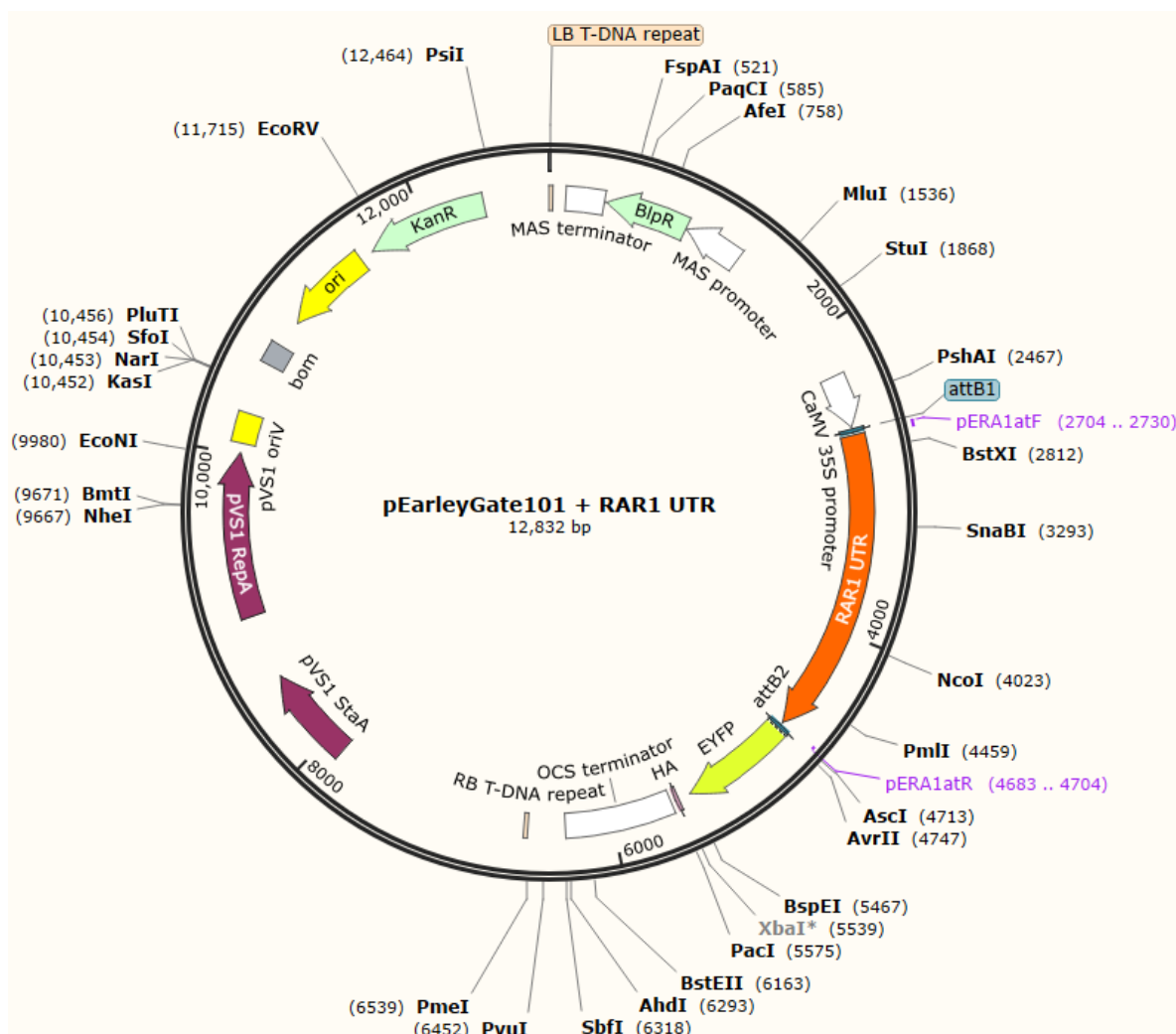


Figura 27. Obtención de la construcción pEarleyGate 101 + *rar1* UTR en el vector de expresión del sistema Gateway.

Las construcciones del gen *rar1* en el vector pEarleyGate 101 pueden replicarse tanto en *Escherichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens* y contienen las secuencias de borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB) necesarias para la transferencia de ADN-T mediada por *Agrobacterium*.

4.4.3 Clonación del gen *npr1* sin UTR de *Arabidopsis thaliana* con el sistema de clonación Gateway.

Se utilizó el vector de entrada pENTR-D TOPO (Thermo Fisher Scientific, Cat. K240020) del sistema de clonación Gateway. Una vez obtenida la ligación del gen *npr1* de *A. thaliana* en el vector de entrada se transformó *E. coli* Top10 con el vector pENTR-D TOPO mediante choque térmico. Se corroboró que *E. coli* Top10 tuviera el gen de interés mediante PCR de colonia (Figura 28).

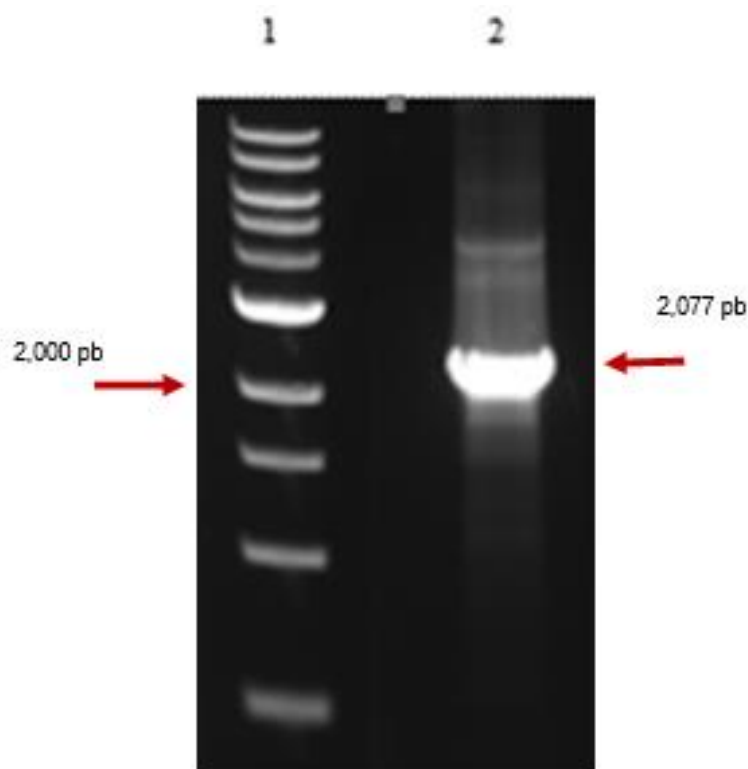


Figura 28. Verificación del del gen *npr1* sin UTR en pENTR D-TOPO por PCR de colonia.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs.

Carril 2: Amplificación con los oligonucleótidos específicos para el gen *npr1*.

La colonia positiva por PCR fue corroborada por restricción enzimática y posterior secuenciación de Sanger (Figuras 29 y 30). Se obtuvo la construcción pENTR-D TOPO + *npr1* sin UTR (Figura 31).

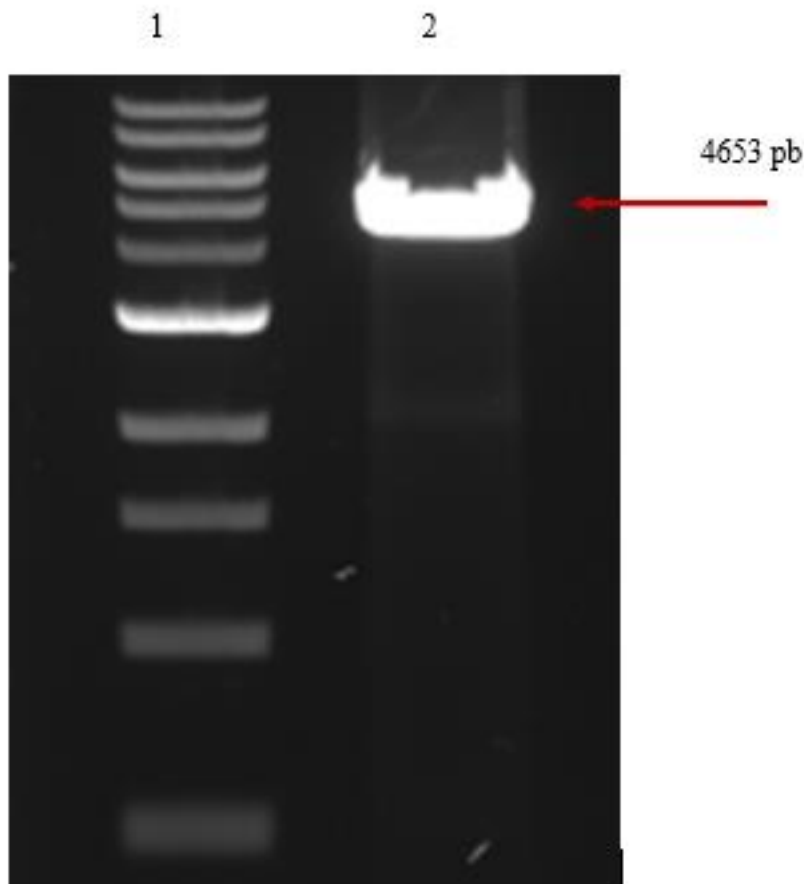


Figura 29. Verificación del fragmento del gen *npr1* sin UTR en pENTR D-TOPO por restricción enzimática.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb de New England Biolabs. Carril 2: Verificación del gen *npr1* (2,077 pb) y el vector de entrada pENTR D-TOPO (2,576 pb) después de la digestión con *Not1* para linealizar el vector (4,653 pb).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F15H21 genomic sequence, complete sequence	Arabidopsis thal...	1770	1770	86%	0.0	98.20%	96887	AC066689.5
✓	Arabidopsis thaliana clone T-Arb-1 non-expressor of PR1 (NPR1) gene, complete cds	Arabidopsis thal...	1770	1770	86%	0.0	98.20%	2277	KF564649.1

Figura 30. Blastn de la secuencia obtenida por secuenciación.

Las dos primeras secuencias corresponden a la secuencia de interés reportada en TAIR (AT1G64280).

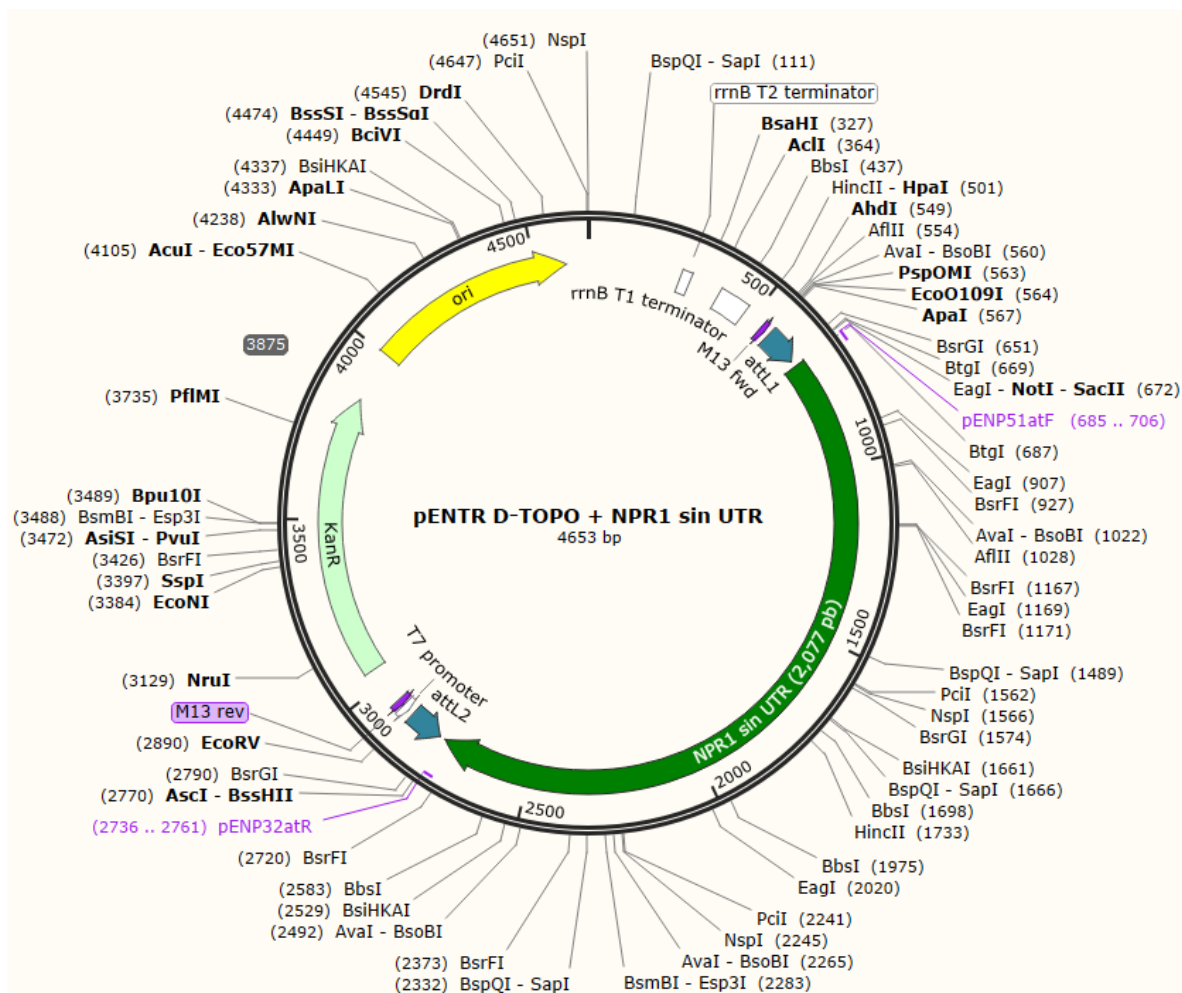


Figura 31. Obtención de la construcción pENTR-D TOPO + *npr1* sin UTR en el vector de entrada del sistema Gateway.

Una vez obtenida la ligación del gen *npr1* sin UTR de *A. thaliana* en el vector de entrada (pENTR-D TOPO) es necesario transferirlo por recombinación hacia el vector de expresión (pEarleyGate 101). Para el gen *npr1* con UTR se siguen verificando colonias presuntamente positivas. Al tener la verificación de *npr1* con UTR se llevará a cabo la recombinación LR del sistema Gateway para posterior transferencia a las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, con el objetivo de llevar a cabo el cocultivo mediante *Agrobacterium* de plantas de tomate con el gen de resistencia *npr1* sin UTR y con UTR.

4.5 Transformación nuclear de tomate mediante co-cultivo con las cepas LBA4404 y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*

Durante la elaboración del cultivo de tejidos vegetales de plantas de tomate, se obtuvieron un total de 11 brotes. Siete brotes para la construcción del gen *rar1* sin UTR usando la cepa LBA4404, y 2 brotes con la cepa GV3101. Para el gen *rar1* con UTR se obtuvieron 2 brotes con LBA4404 y al momento no se han obtenido brotes en GV3101. Es importante mencionar que es necesario seguir trabajando en la estandarización de esta técnica y poder optimizar las concentraciones del agente de selección y los reguladores de crecimiento puesto que, al momento, solo hemos podido mantener un brote debido a la oxidación, además es necesario seguir llevando a cabo este procedimiento con el fin de obtener una mayor cantidad de brotes. Se sigue trabajando en la técnica para la obtención de brotes presuntamente transformados.

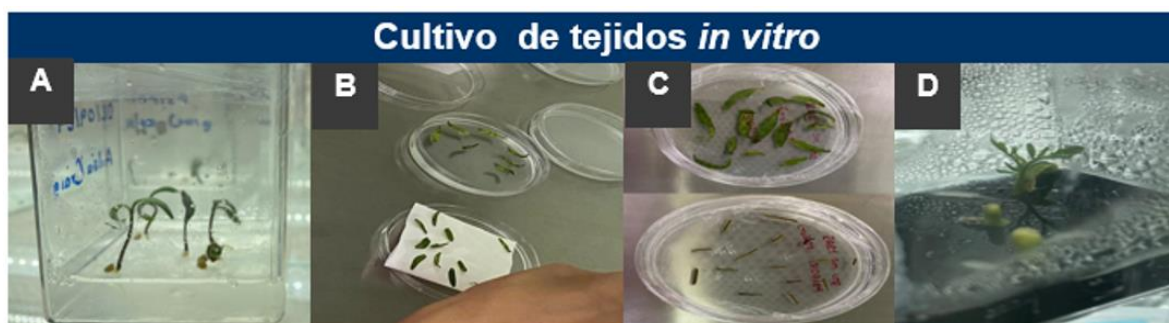


Figura 32. Cultivo de tejidos *in vitro*.

A) Germinación de plantas de tomate en Medio MS. **B)** Infección de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el gen de interés *rar1*. **C)** Explantes en medio de cocultivo para la transferencia de ADN. **D)** Cambio de explantes a medio de regeneración con el agente de selección BASTA 0.75 mg/L y antibiótico para eliminar la agrobacteria Cefotaxima 250 mg/L, hasta la obtención de brotes.

V. Discusión

5.1 Detección de las enfermedades ocasionadas por *Candidatus Liberibacter* spp. en San Luis Potosí.

La implementación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades en plantas, como la PCR convencional y la PCR en tiempo real, ha transformado significativamente la precisión y sensibilidad en la detección de patógenos de plantas como *Candidatus Liberibacter* spp. Estas herramientas permiten identificar la presencia del patógeno incluso en fases tempranas de infección, cuando aún no se presentan síntomas visibles, lo que representa una ventaja crucial para la contención y manejo oportuno de enfermedades emergentes como el Huanglongbing o el permanente del tomate (Cellier *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2006). A diferencia del diagnóstico basado exclusivamente en la sintomatología, que puede ser confuso debido a la similitud de síntomas entre distintas enfermedades o su manifestación tardía, las técnicas moleculares ofrecen especificidad y confiabilidad. Por ejemplo, síntomas como amarillamiento de hojas, deformación de frutos o enanismo pueden ser provocados por múltiples agentes patógenos o incluso por deficiencias nutricionales, dificultando un diagnóstico preciso sin el apoyo de pruebas moleculares (Bové, 2006; INTAGRI, 2017). Además, los métodos moleculares permiten la cuantificación del patógeno, lo que contribuye a entender la dinámica de la infección y evaluar la eficacia de tratamientos o estrategias de resistencia. Esto es especialmente importante en estudios epidemiológicos y programas de vigilancia fitosanitaria, donde el diagnóstico temprano puede marcar la diferencia entre el control y la diseminación de una enfermedad (Hu *et al.*, 2021; Makam *et al.*, 2023). Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran la presencia de *Candidatus Liberibacter* en cultivos de cítricos y solanáceas, (*Citrus sinensis*) y (*Solanum lycopersicum*) en varias regiones del estado de San Luis Potosí. Esto corrobora la evidencia de Hansen *et al.* (2008) y Liefting *et al.* (2009), que esta bacteria es genéticamente diversa con sólida

capacidad de adaptación y expansión a diversas plantas hospedantes incluyendo solanáceas como el tomate.

Aunque no fue posible detectarla en plantas de chile (*Capsicum annuum*) por métodos moleculares como PCR de punto final, es posible que esto sea debido a que hace falta implementar un método más sensible para la detección y cuantificación como PCR en tiempo real, lo cual estamos implementando en el laboratorio. En las muestras de cítricos la PCR de punto final solo pudo detectar las muestras que en PCR tiempo real estaban por arriba de cuatro órdenes de magnitud (ver Tabla 6, muestra 1, 11 y 12). El uso de PCR convencional permitió una primera aproximación efectiva al monitoreo, sin embargo, se evidenció la necesidad de incorporar métodos más sensibles que pueden cuantificar al patógeno, como la PCR en tiempo real, para lograr una detección precisa y en fases tempranas de infección (Li *et al.*, 2006; Cellier *et al.*, 2020). Esta observación concuerda con lo reportado por diversos autores como Morgan *et al.* (2012), que destacan la superioridad de los métodos cuantitativos en estudios epidemiológicos. El hallazgo de *Candidatus Liberibacter* en tomate podría representar un importante riesgo fitosanitario, considerando la posible transmisión cruzada por vectores como *B. cockerelli* el cual representa un riesgo significativo debido a su alta prevalencia, capacidad de dispersión y eficiencia como vector de CaLso, afectando de forma directa e indirecta la producción de tomate, chile y papa en México (Hansen *et al.*, 2008; Melgoza *et al.*, 2018), lo cual refuerza la necesidad de establecer vigilancia integrada en sistemas de cultivo mixtos.

5.2 Clonación de genes de resistencia

La sobreexpresión de genes que puedan conferir resistencia contra enfermedades ocasionadas por bacterias es un método de control que se ha estado explorando recientemente. El gen no expresor de genes (*npr1*) de *Arabidopsis thaliana* se ha probado en plantas de cítricos con el fin de aumentar su resistencia contra HLB.

NPR1 activa las respuestas inmunológicas de las plantas y es un factor clave de la vía de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). NPR1 interactúa con varios factores

de transcripción importantes en la respuesta de defensa de plantas como TGA, activando genes como PR1 durante la respuesta a patógenos. Factores como WRKY18 interactúan con *npr1* en la regulación de genes de defensa (Vera-Aguilar, 2014).

Por otro lado, NPR1 es el receptor del ácido salicílico que controla la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) (Pirnia, 2016). Dutt *et al.* (2015), demostraron que los cítricos transgénicos que sobreexpresan el gen *npr1* de *Arabidopsis thaliana* presentan una mayor tolerancia a la infección por HLB en comparación con plantas sin modificaciones. Estas plantas presentaron menores niveles de la bacteria *Candidatus Liberibacter*, lo que sugiere que la introducción de un gen *npr1* más activo frena el avance de la enfermedad. Además de tolerar mejor al HLB, las plantas transgénicas mostraron un crecimiento superior y mayor producción de fruta bajo condiciones de infección.

Algunos ejemplares permanecieron libres de la enfermedad durante más de 36 meses bajo la presencia del patógeno. Adicionalmente, la sobreexpresión del gen *npr1* activó genes nativos relacionados con la defensa, sugiriendo un mecanismo efectivo contra la infección. Finalmente demostraron que el promotor AtSUC2 que es específico de floema, fue mejor que el promotor CaMV 35S (Dutt *et al.*, 2015).

Por otro lado, en arroz Wang *et al.* (2008), demostraron en arroz que al sobreexpresar los genes *OsRar1* y *OsSGT1* se incrementa significativamente la resistencia basal contra la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, causante del tizón bacteriano, así como contra varias razas del hongo *Magnaporthe oryzae*, responsable de la enfermedad del "blanco" en arroz. Estos estudios destacan la capacidad de la ingeniería genética para crear plantas de cítricos y cultivos de arroz, más resistentes mediante la incorporación de genes que potencian sus defensas naturales.

Por otro lado, en la clonación y sobreexpresión de genes de resistencia en plantas, el uso de secuencias reguladoras como las regiones no traducidas (UTRs, por sus siglas en inglés) es un aspecto crítico para lograr una expresión eficiente, estable y funcional de los transgenes. Las UTRs, ubicadas en los extremos 5' y 3' de los genes, no codifican proteínas, pero desempeñan roles fundamentales en la

regulación de la transcripción, estabilidad del ARNm, eficiencia de traducción y localización subcelular del mensajero (Srivastava *et al.*, 2018).

En esta investigación, la clonación de *rar1* y *npr1* mediante el sistema Gateway consideró la posibilidad de incluir sus UTRs para mantener la funcionalidad biológica del gen tal como ocurre en su contexto nativo y compararlo con la clonación sin la región 5' UTR. Ya contamos con el gen *rar1* y falta el gen *npr1*.

5.3 Métodos de transformación en plantas

La transformación genética de plantas ha evolucionado significativamente en las últimas décadas, convirtiéndose en una herramienta fundamental para la mejora genética y el estudio funcional de genes. En este trabajo, se exploraron metodologías de cultivo *in vitro* y transformación genética en tomate (*Solanum lycopersicum*), una especie modelo ampliamente utilizada debido a su genoma bien caracterizado, su facilidad de manipulación en laboratorio y su importancia económica y alimentaria (Eck *et al.*, 2006).

El cultivo *in vitro* de tomate constituye la base del proceso de transformación, ya que permite la regeneración de plantas completas a partir de tejidos diferenciados. En este estudio, se utilizó un sistema basado en la regeneración a partir de segmentos de hipocótilo o cotiledón, que ha demostrado ser eficiente en genotipos comerciales e híbridos. La elección de un medio de cultivo adecuado, enriquecido con reguladores de crecimiento como la zeatina y el ácido naftalenacético (ANA), fue clave para promover la organogénesis eficiente (Figura 32).

En cuanto a la transformación genética, se empleó el método de co-cultivo mediado por *Agrobacterium tumefaciens* y acetosiringona (Soria-Guerra, 2007; Rodríguez-González, 2014). Este sistema aprovecha la capacidad natural de *Agrobacterium* para transferir genes a células vegetales a través del plásmido Ti modificado.

Uno de los principales desafíos en la transformación de tomate es la selección efectiva de tejidos transformados sin comprometer la regeneración, nosotros probamos hipocótilos y cotiledones. Por otro lado, en este estudio se utilizó Glufosinato de amonio (BASTA), permitiendo la diferenciación de tejidos transgénicos desde etapas tempranas del cultivo. Los resultados indican que es

necesario estandarizar y optimizar las concentraciones del agente selectivo, los reguladores de crecimiento y los tiempos de exposición ya que la mayoría de nuestros explantes presuntamente transformados se oxidaron y murieron.

Finalmente, este sistema *in vitro* combinado con transformación genética proporciona una plataforma robusta para la inserción de genes de interés, como *rar1* o *npr1*, que están relacionados con la respuesta inmune en plantas. Esto sienta las bases para el desarrollo de cultivares con resistencia mejorada a patógenos como *Candidatus Liberibacter* spp. agente causal de varias enfermedades en cultivos de cítricos y solanáceas. Falta obtener plantas de la generación T2 para poder retarlas con un vector que lleve la bacteria y ver si puede tolerar la enfermedad.

VI. Conclusiones

1. Los cultivos de cítricos y solanáceas en San Luis Potosí presentan signos claros de las enfermedades ocasionadas por *Candidatus Liberibacter* spp.
2. Aunque es posible monitorear la presencia de las especies de *Ca. Liberibacter* en cultivos de cítricos y solanáceas por PCR punto final, es importante usar técnicas más sensibles como la PCR en tiempo real para evitar los falsos negativos.
3. Es necesario generar controles positivos para utilizarlos en el diagnóstico de las especies de *Ca. Liberibacter* mediante PCR de punto final.
4. Es posible clonar los genes de *A. thaliana rar1* y *npr1*, los cuales podrían conferir resistencia a enfermedades bacterianas, mediante el sistema Gateway.
5. Es posible obtener brotes de tomate presuntamente transformados con el gen *rar1* mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. Sin embargo, es importante estandarizar la técnica para evitar la oxidación y muerte de los explantes, y obtener un número mayor de brotes para poder analizarlos por PCR.
6. Es necesario generar estrategias para controlar el vector de transmisión y así evitar el desarrollo de las enfermedades ocasionadas por *Ca. Liberibacter* spp. debido a que se ha encontrado a esta bacteria en diferentes localidades del estado.

VII. Perspectivas

1. Continuar con el monitoreo de *Candidatus Liberibacter* spp. en cultivos de cítricos y solanáceas en SLP en asociación con las juntas locales de sanidad vegetal.
2. Implementar un método de PCR en tiempo real para cuantificar la carga bacteriana de *Ca. Liberibacter solanacearum* en cultivos de solanáceas.
3. Verificar la construcción de *npr1* UTR de *A. thaliana* en el vector pENTR-D TOPO por secuenciación de Sanger.
4. Transferir los genes *npr1* con y sin UTR de *A. thaliana* del vector de entrada pENTR-D TOPO al vector de expresión pEarleyGate101 por recombinación LR del sistema Gateway.
5. Transferir los genes *npr1* con y sin UTR de *A. thaliana* en pEarleyGate 101 cepa Top10 de *E. coli* a las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y GV3101 por electroporación.
6. Continuar con la transformación de plantas de tomate mediante co-cultivo con las cepas de *A. tumefaciens* que albergan los genes *rar1* y *npr1* con y sin UTR de *A. thaliana*.
7. Obtener semillas de la T0 de plantas de tomates transformadas con el gen *rar1* y *npr1* para estudios de resistencia al PT.
8. Realizar un reto con plantas transformadas y plantas WT de tomate y el insecto vector proveniente de un cultivo con sintomatología de CaLso en un invernadero controlado.

9. Probar métodos de control biorracional para mitigar la enfermedad de HLB en cítricos y monitorear su efectividad en la disminución de la carga bacteriana por qPCR.

VIII. Referencias

- Ammar, E. D., Ramos, J. E., Hall, D. G., Dawson, W. O., y Shatters Jr., R. G. (2016). Acquisition, replication and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following various acquisition periods on huanglongbing-infected citrus by nymphs and adults of the Asian citrus psyllid. *PLoS One*, 11(7), e0159594.
- Andrade, M., Li, J., y Wang, N. (2020). *Candidatus Liberibacter asiaticus*: virulence traits and control strategies. *Tropical Plant Pathology*, 45, 285-297.
- Backer, R., Naidoo, S., y Van den Berg, N. (2019). The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) and related family: mechanistic insights in plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 102.
- Bertero, A., Brown, S., y Vallier, L. (2017). Methods of cloning. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 19-39). Academic Press.
- Boller T y 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>.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 7-37.
- CABI. 2018. Invasive Species Compendium. *Liberibacter africanus* (African greening). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16564>. Fecha de consulta: septiembre de 2024.
- CABI. 2019. Distribution Maps of Plant Disease. *Candidatus Liberibacter asiaticus* [Distribution map] En línea: <https://www.cabi.org/dmpd/abstract/20173134805>. Fecha de consulta septiembre de 2024.
- Cellier, G., Redondo, C., Cubero, J., Roselló, M., de Andrade, E., Cruz, L., ... y Giovani, B. (2020). Comparison of the performance of the main real-time and conventional PCR detection tests for '*Candidatus Liberibacter*' spp., plant pathogenic bacteria causing the Huanglongbing disease in *Citrus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 157, 919-941.
- Ding, F., Duan, Y., Paul, C., Bransky, R. H., y Hartung, J. S. (2015). Localization and distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus and periwinkle by

- direct tissue blot immuno assay with an anti-OmpA polyclonal antibody. *PLoS One*, 10(5), e0123939.
- Durrant, W. E., y Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>.
- Dutt, M., Barthe, G., Irey, M., y 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, Oppen K, Juehne T, Song K, y 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>.
- Eck, J. V., Kirk, D. D., y Walmsley, A. M. (2006). Tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Agrobacterium Protocols*, 459-474.
- 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-podriaamenazar-cultivos-agricolas-del-pais-3601667.html>.
- Engler C y Marillonnet S. 2014. Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology*, 1116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9
- FAO. (2022). FAOSTAT - Crops. <https://www.fao.org/faostat/>
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16(suppl_1), S170–S180.
- Granados-Ramírez, R., Hernández-Hernández, R., y León-García, I. (2022). Presencia del HLB en Colima, México. Alternativas de adaptación. *Revista Inclusiones*, 24-40.
- González Segnana, L. R., Acosta Aveiro, D. R., Pino Quintana, C. D., y González Espínola, D. D. (2020). Comparación del método de reacción almidón-iodo con la amplificación por polimerasa y recombinasa para el diagnóstico del Huanglongbing (HLB) de los cítricos. *Investigación Agraria*, 22(2), 100-105.

- Haapalainen, M. (2014). Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 172-198.
- Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R., y Paine, T. D. (2008). A new huanglongbing species, "*Candidatus Liberibacter psyllaurous*," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5862-5865.
- Hu, B., Rao, M. J., Deng, X., Pandey, S. S., Hendrich, C., Ding, F., ... y Xu, Q. (2021). Molecular signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLoS pathogens*, 17(12), e1010071.
- INTAGRI. 2017. La Enfermedad del "Permanente del Tomate". Serie Fitosanidad. Núm. 83. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 p. Extraído de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/la-enfermedad-del-permanente-del-tomate>.
- Jagoueix, S., Bove, J. M., y 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 and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 379-386.
- Jones, J. D. G., y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- Kuai, X., MacLeod, B. J., y Després, C. (2015). Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Frontiers in Plant Science*, 6, 235.
- Kumar, S., Zavaliev, R., Wu, Q., Zhou, Y., Cheng, J., Dillard, L., ... y Zhou, P. (2022). Structural basis of NPR1 in activating plant immunity. *Nature*, 605(7910), 561-566.
- Li, W., Hartung, J. S., y Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 104-115.
- Liefting, L. W., Weir, B. S., Pennycook, S. R., y Clover, G. R. (2009). '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family

- Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(9), 2274-2276.
- Makam, S. N., Setamou, M., Alabi, O. J., Day, W., Crome, D., y Nwugo, C. (2023). Mitigation of Huanglongbing: Implications of a biologically enhanced nutritional program on yield, pathogen localization, and host gene expression profiles. *Plant Disease*, 107(12), 3996-4009.
- Melgoza C, León C, López J, Hernández L, Velarde S, y 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>.
- Merfa, M. V., Pérez-López, E., Naranjo, E., Jain, M., Gabriel, D. W., y De La Fuente, L. (2019). Progress and obstacles in culturing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology*, 109(7), 1092-1101.
- Microbe Notes. (2022). *Agrobacterium-mediated gene transfer*. Recuperado el 18 de mayo de 2025, de <https://microbenotes.com/agrobacterium-mediated-gene-transfer/>
- Morgan, J. K., Zhou, L., Li, W., Shatters, R. G., Keremane, M., y Duan, Y. P. (2012). Improved real-time PCR detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes*, 26(2), 90-98.
- Munyanza, J. E., Crosslin, J. M., y Upton, J. E. (2007). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip,” a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 656-663.
- Murray, R. G. E., y Stackebrandt, E. (1995). Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 186-187.

- Muskett, P. R., Kahn, K., Austin, M. J., Moisan, L. J., Sadanandom, A., Shirasu, K., ... y Parker, J. E. (2002). Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *The Plant Cell*, 14(5), 979-992.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., y Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pirnia, S. (2016). Novel plant DNA binding protein: Non-expressor of pathogenesis related 1 gene (NPR1) involved in disease resistance. Doctoral thesis, Brock University, ON, Canada.
- Poveda, J., Roeschlin, R. A., Marano, M. R., y Favaro, M. A. (2021). Microorganisms as biocontrol agents against bacterial citrus diseases. *Biological Control*, 158, 104602.
- Rodríguez-González, E. M. (2014). Obtención de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sobreexpresantes del gen SCE1, como candidato a conferir resistencia contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tesis de maestría. San Luis Potosí, México.
- SENASICA. 2019. Ficha técnica Huanglongbing 'Candidatus Liberibacter spp.' Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal - Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Con la colaboración del Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LaNREF) Cd. de México. Ficha técnica 78 Última actualización: abril, 2019. 34p.
- SENASICA. (2023). Informe anual 2023: Plagas de los cítricos. Gobierno de México.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/885845/13_Informe_anual_2023_Plagas_de_los_citricos.pdf
- Sharma, A., Gupta, A. K., y Devi, B. (2023). Current trends in management of bacterial pathogens infecting plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 116(4), 303-326.
- SIAP. (2023). Anuario estadístico de la producción agrícola en México.
<https://www.gob.mx/siap>

- Soria-Guerra, R. E. (2007). Expresión en tomate de un polipéptido antigénico con epítomos de 3 exotoxinas bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético. Tesis de doctorado. San Luis Potosí, México.
- Srivastava, A. K., Lu, Y., Zinta, G., Lang, Z., y Zhu, J. K. (2018). UTR-dependent control of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 23(3), 248-259.
- Stover, E., McCollum, G. T., Driggers, R., Lee, R., Shatters Jr, R., Duan, Y., ... y Hall, D. G. (2015). Resistance and tolerance to Huanglongbing in citrus. *Acta Horticulturae*, 1065, 899-903.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., y Shirasu, K. (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11777-11782.
- Teixeira, D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., Je-sus, W. C., Jr., Yamamoto, P. T., Lopes, S. A., Bas-sanezi, E. B., Ayres, A. J., Saillard, C., y Bové, J. M. (2005). Citrus huanglongbing in São Paulo, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes*, 19:173-179.
- Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R. W., & Dangl, J. L. (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *The Plant Cell*, 14(5), 1005-1015.
- USDA. (2003). *USDA Seminar June 2003*. Southwest Florida Research and Education Center, University of Florida. <https://swfrec.ifas.ufl.edu/>
- Vera-Aguilar, A. (2014). Clonación y caracterización de un ADN complementario que codifica para un factor de transcripción de la familia WRKY en *Citrus sinensis*. Tesis de maestría, Yucatán, México.
- Wan, J., Wang, R., Ren, Y., y McKirdy, S. (2020). Potential distribution and the risks of *Bactericera cockerelli* and its associated plant pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* for global potato production. *Insects*, 11(5), 298.

- Wang, Y., Gao, M., Li, Q., Wang, L., Wang, J., Jeon, J. S., ... y He, Z. (2008). OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 294-303.
- Wang, N., y Trivedi, P. (2013). Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, 103(7), 652-665.
- Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., ... y Martins Jr, J. (2017). The *Candidatus* Liberibacter–host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 451-482.
- Wang, Y., Zhang, Y., et al. (2020). Tomato: From model plant to crop improvement. *Molecular Horticulture*, 1(1), 1-23.
- Zhang, M., Guo, Y., Powell, C. A., y Duan, Y. (2014a). Evaluation of antibiotics against the bacteria, *Candidatus* Liberibacter for control of citrus Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology*, 1(1).
- Zhang, M., Guo, Y., Powell, C. A., Doud, M. S., Yang, C., y Duan, Y. (2014b). Effective antibiotics against '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PloS one*, 9(11), e111032.

IX. Anexos

9.1 Mezcla basal de sales MS

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100 X (g/L)
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
MS III	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 mL a 4°C.

9.2 Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20 °C.

9.3 Material biológico

Nombre	Proveedor
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101 y LBA4404	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, USA
Vector de clonación pGEM®-T Easy	Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Donada por el Dr. Argüello-Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Semilla de tomate var. Ailsa Craig	Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Vector de expresión en plantas pEarleyGate 101, 100 y 104	Donados por la Dra. Fabiola Jaimes Miranda del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Semilla de tomate var. Micro-Tom	Donadas por la Dra. Fabiola Jaimes Miranda del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>rar1</i> y <i>npr1</i> de <i>A. thaliana</i>	Secuencias diseñadas por el Mtro. Maximiliano Tenorio Valdez
Vector de entrada pENTR-D TOPO	Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

9.4 Equipo

- Agitador magnético/placa caliente CORNING modelo PC-420
- Agitador orbital Lumistell modelo AOM-300
- Agitador Thermo Scientific modelo Multi-purpose rotator
- Balanza analítica OHAUS modelo Pioneer
- Balanza analítica SCIENTECH modelo SA210D
- Balanza granataria OHAUS modelo 1400
- Baño María digital Fisher Scientific modelo ISOTEMP 1025
- Calentador de baño seco Fisher Scientific
- Calentador Thermo mix modelo HCM100-PRO
- Cámara de electroforesis Mini-Horizontal Unit Fisher Biotech
- Campana de extracción de humos Fisher modelo CS
- Campana de flujo laminar Fisher Alder
- Centrífuga BECKMAN COULTER modelo Avanti J-301
- Centrífuga de mesa megafuge 1.0 modelo Heraeus
- Centrífuga Eppendorf modelo MiniSpin
- Centrífuga refrigerada Hettich modelo UNIVERSAL 320 R
- Electroporador BTX modelo ECM 630
- Espectrofotómetro BIO-RAD modelo smartspec plus
- Espectrofotómetro Thermo Scientific modelo NanoDrop 2000
- Fotodocumentador BIO-RAD modelo ChemiDocMP

- Fotodocumentador BIO-RAD modelo Gel Doc XR+
- Fuente de poder BIO-RAD modelo PowerPac Basic
- Termociclador Applied Biosystem 7500 Fast
- Fuente de poder Thermo EC
- Horno de microondas Mabe
- Incubadora agitadora HIPOTECH modelo H2OcX300
- Microcentrífuga refrigerada Kendro Laboratory Products modelo Heraeus
- Micropipetas Gilson
- Microscopio estereoscópico Leica
- Potenciómetro Thermo modelo Orion Star
- Procesador ultrasónico SONICS modelo Vibra cell
- Refrigerador a 4°C TORREY
- Congelador vertical a -21°C FRIGIDAIRE modelo FFFH21F6QW
- REVCO Thermo Scientific modelo Value plus
- Rotador Benchmark Scientific modelo Roto-MiNi
- Incubadora para laboratorio Lúmina modelo IRO-65
- Sistema de transferencia BIO-RAD modelo Trans-Blot Turbo
- Vórtex Scientific Industries modelo genie 2
- Cámara bioclimática de plantas Lumistell modelo MAC-510
- Cuarto acondicionado para cultivo *in vitro* Lumistell modelo AS-016
- Invernadero