



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**  
**Maestría en Ciencias con Orientación en**  
**Biotecnología**

**Distribución y Cuantificación Espacio -  
Temporal de *Candidatus Liberibacter*  
solanacearum en Plantas de  
*Solanum lycopersicum* L.**

# **T E S I S**

que presenta  
**IBT Germán Juárez Corral**  
para la obtener  
el grado de  
**Maestro en Ciencias con**  
**Orientación en**  
**Biotecnología Agroalimentaria**

**Director de Tesis**  
**Dr José Antonio Garzón Tiznado**

**Culiacán Rosales, Sinaloa febrero 2018**

## **Presentación**

La presente investigación titulada “Distribución y Cuantificación Espacio-Temporal de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en Plantas de *Solanum lycopersicum* L.” se llevó a cabo en el “Laboratorio de Patología y Biología Celular y Molecular”, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. El ensayo biológico se desarrolló en instalaciones de la Empresa Vilmorim Inc., Culiacán, Sinaloa, México. Los C Dra Claudia del Rosario León Sicairos, Dr Roberto Gutiérrez Dorado y Dr José Angel Valenzuela López participaron como Asesores Académico. El Dr José Antonio Garzón Tiznado fungió como Director de Tesis. Durante sus estudios de posgrado el C. Germán Juárez Corral recibió “Beca Nacional para Estudios de Posgrado” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). También recibió apoyos económicos, tipo Beca, a través del “Programa de Fomento a Proyectos de Investigación” (PROFAPI 2014/078), Universidad Autónoma de Sinaloa y de la Empresa Vilmorim Inc.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada en el periodo que me permitió desarrollar los estudios de maestría, así como al proyecto PROFAPI 2014/078 por los recursos económicos otorgados para llevar a cabo esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme los recursos materiales y humanos necesario para mi formación.

A los integrantes de mi H Comité Tutorial: Dra. Claudia del Rosario León Sicarios, Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y Dr. José Ángel López Valenzuela por sus valiosos consejos y asesoramiento.

A Dr. José Antonio Garzón Tiznado por otorgarme la oportunidad de poder colaborar en su equipo de trabajo, además por brindarme de manera oportuna los recursos necesarios, su valioso tiempo, consejos, paciencia y asesorías para que esto fuera posible.

Al Dr. Enrique Retes por facilitarme en gran medida sus instalaciones y materiales para que este trabajo fuera posible, así como su apoyo y asesoría que me resultaron de mucha utilidad en mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio Luis, Sergio, Isais y Elton que facilitaron mi labor al brindarme su apoyo técnico y moral cuando era necesario.

A mi esposa Luz María por su paciencia y apoyo en todo momento y a mi amado hijo, motivo de inspiración y esfuerzo para mi vida.

A mis padres y hermanas porque ellos son parte de lo que realmente ahora soy.

## INDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I. RESUMEN	1
ABSTRACT	5
II. INTRODUCCIÓN	8
III. REVISION DE LITERATURA	12
A. <i>BACTERICERA COCKERELLI SULC</i>	12
1. Origen	13
2. Biología y ciclo de vida	13
3. Características morfológicas y taxonómicas	14
a. Huevecillos	14
b. Ninfas	16
c. Adultos	17
4. Distribución Geográfica	18
5. Hospedantes	21
B. DAÑOS CAUSADOS POR <i>B. COCKERELLI</i> .	21
1. Amarillamiento por el psílido	21
2. Permanente del tomate	23
3. Enfermedad del manchado de la papa “Zebra chips”	24
C. BACTERIAS DEL GENERO <i>CANDIDATUS LIBERIBACTER</i>	30
1. <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter solanacearum</i>	32
2. <i>Bactericera cockerelli</i> como vector de <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter solanacearum</i>	36
3. Detección y cuantificación de <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter</i> <i>solanacearum</i>	37
a. Detección por PCR punto final	37
b. Cuantificación de CLs por PCR en tiempo real	37
c. Problemas en la detección de CLs	38
IV. JUSTIFICACIÓN	40
V. OBJETIVOS	41
A. OBJETIVO GENERAL	41
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	42
A. MATERIALES	42
1. Localización del estudio	42
2. Clima	42
3. Área de experimentación	43
4. Establecimiento y cuidado de plantas de tomate	43
a. Germinación de <i>Solanum lycopersicum</i> L	43

b.	Mantenimiento en invernadero de <i>Solanum lycopersicum</i> L	44
c.	Trasplante de <i>Solanum lycopersicum</i> L	44
d.	Condiciones de manejo de <i>Solanum lycopersicum</i> L en cámara climática	44
5.	Establecimiento de la colonia <i>B. cockerelli</i> y fuente de inóculo <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	45
6.	Bioensayo de transmisión de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	45
a.	Transmisión	45
b.	Muestreo y monitoreo	46
A	MÉTODOS	47
1.	PCR punto final	47
a.	Identificación de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	47
1)	Extracción de DNA en plantas e insectos	47
2)	PCR punto final	48
3)	Electroforesis en gel de agarosa	49
2.	Cuantificación de CLs por PCR en tiempo real	49
a.	Diseño de oligonucleótidos	49
b.	Evaluación de oligonucleótidos	52
3.	Obtención de DNA de referencia	56
a.	Extracción de ADN plasmídico	56
1)	Confirmación gen 16S en la solución de referencia por PCR punto final	57
2)	Estimación de la concentración del gen 16S	57
3)	Elaboración de la curva de calibración estándar	58
4.	Análisis estadístico	59
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
A.	ESTABLECIMIENTO DE EL MATERIAL BIOLÓGICO.	62
1.	Establecimiento y cuidado de planta de tomate	62
2.	Establecimiento de <i>B. cockerelli</i>	62
3.	Establecimiento y detección por PCR punto final de fuente de inóculo	63
B.	BIOENSAYO DE TRANSMISIÓN DE CLs A PLANTAS DE TOMATE	66
1.	Presencia de síntomas del permanente de tomate	66
C.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR PUNTO FINAL	71
D.	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE CLs POR PCR EN TIEMPO REAL	73
1.	Diseño de oligonucleótidos	73
2.	Evaluación de oligonucleótidos	73
a.	Especificidad	
3.	Curva de calibración y cuantificación de muestras	81

a. Linealidad	81
b. Eficiencia y curva de calibración	81
E. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR EN TIEMPO REAL	85
F. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR EN TIEMPO REAL	85
G. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR EN PUNTO FINAL Y PCR EN TIEMPO REAL	86
H. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
1. Análisis de asociación espacio temporal de <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter solanacearum</i> en plantas de tomate	89
2. Análisis de varianza espacio temporal de las concentraciones de <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter</i> <i>solanacearum</i> en plantas de tomate	94
VIII. CONCLUSIONES	97
IX. BIBLIOGRAFÍA	98
Abreviaturas	107

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Relación de ciclo de vida y unidades de calor para <i>Bactericera cockerelli</i> .	15
2	Principales hospedantes (Solanáceas) de <i>B. cockerelli</i> , en donde se alimenta, reproduce e hiberna.	22
3	Condiciones de reacción para la amplificación de CLs.	50
4	Características de los oligonucleótidos en PCR punto final	51
5	Mezcla de reactivos para la cuantificación de muestras estandar y problema por PCR tiempo real.	60
6	Resultados de la concentración de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en los diferentes órganos de planta de tomate a través del tiempo	88
7	ANOVA de la distribución espacio temporal de CLs en los diferentes órganos de planta de tomate	96

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Morfología de <i>Bactericera cockerelli</i>	19
2	Sintomatología en plantas de tomate causadas por la enfermedad PT.	25
3	Planta de papa con síntomas de punta morada.	28
4	Tubérculo de la papa con síntomas de manchado de la papa	29
5	Conductos de floema infectados con <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por microscopia electrónica.	33
6	Microfotografía de floema de plantas de tomate infectadas con OTB.	35
7	Secuencia nucleotídica del gen 16S muestra 116	53
8	Condiciones de termociclador qPCR	55
9	Establecimiento del hospedero <i>Solanum lycopersicum</i> L	64
10	Separación electroforética de amplicones de CLs en gel de agarosa.	65
11	Procedimientos de inoculación de CLs.	67
12	Planta de <i>Solanum lycopersicum</i> L manifestando síntomas el permanente del tomate	68
13	Plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L inoculadas con <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> a través del tiempo	70
14	Geles de agarosa al 1% del gen 16S de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> resultantes del bioensayo	74
15	Incidencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en plantas de tomate a través del tiempo	77
16	Análisis <i>In silico</i> de oligonucleótidos F-CLs-263 y R-CLs-263	79
17	Curva de disociación de oligonucleótidos F-CLs-263 y R-CLs-263.	80
18	Curva de calibración estándar de pDNA clona 116	83



19	Eficiencia de reacción y coeficiente de correlación de curva de calibración estandar.	84
20	Concentración de CLs acumulada en los órganos de raíz, tallo y hoja de planta de tomate a traves del tiempo.	87
21	Gráfica de interacciones entre el tiempo y la concentración de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en diferentes organos de planta de tomate	91
22	Gráfica de la concentración promedio de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en diferentes órganos de plantas de tomate a traves del tiempo	92
23	Gráfica de residuos del analisis de regresión de poisson	93

## I. RESUMEN.

El permanente del tomate, punta morada de la papa o zebra chips y brotes de clorosis en Chile actualmente se catalogan como enfermedades de gran importancia por las pérdidas económicas que causan a los cultivos de las principales zonas productoras de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y Chile (*Capsicum annuum*) en el Centro y Norte de América y Nueva Zelanda. Estas enfermedades son causadas por el organismo tipo bacteria (OTB) *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLs), una alfa-proteobacteria gram negativa, restringida al floema, endosimbionte secundario no cultivable que es propagada por el proceso de alimentación del psílido de la papa/tomate *Bactericera cockerelli*. La ausencia de procedimientos curativos dificulta el control de estas enfermedades de tal manera que la estrategia más viable es la prevención. Además, el complejo ambiente en el que interactúa la bacteria con los hospedantes ha hecho difícil su control y representa una de las causas del limitado éxito en el manejo de la enfermedad, por lo que el conocer características como la distribución y concentración del patógeno dentro del hospedante son determinantes para comprender su comportamiento. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tiempo en la distribución de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en la raíz, tallo y hoja de la planta *Solanum lycopersicum* L por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR). Se diseñó un bioensayo para la evaluación del efecto de CLs en plantas de tomate de la variedad V305 mediante la transmisión directa por psílido, dejando así que *Bactericera cockerelli* se alimentase por un periodo de 72 horas, posteriormente se realizaron 5 muestreos destructivos cada 14 días de 3 diferentes órganos en la planta (raíz, tallo y hoja) por cuadruplicado. Durante dicho periodo se monitoreó la aparición de síntomas del permanente del tomate y detección de CLs por PCR convencional (cPCR), finalmente se estandarizó la metodología de cuantificación por qPCR diseñando oligonucleótidos para el gen 16S DNA ribosomal (rDNA) de CLs y evaluando criterios en la metodología como eficiencia de reacción, rango de linealidad y especificidad del método. Los síntomas del permanente de tomate fueron observados hasta después de 56 días, presentándose un daño físico progresivo a través del tiempo, desarrollándose síntomas como aborto de la flor, folíolos reducidos, hojas enrolladas y quebradizas, clorosis apical, oscurecimiento en la base del tallo y raíz. La incidencia de CLs en cPCR se encontró en su mayoría en tallo (80%) con excepción del primer muestreo (14 días), mientras que la menor frecuencia del patógeno se observó en la raíz (20%), en tanto las muestras de hoja presentaron una incidencia de 28%. Por otro lado, los oligonucleótidos diseñados para qPCR fueron específicos con un  $T_m$  de 82.64 °C y ausencia de amplificaciones secundarias. La eficiencia y linealidad de la reacción fueron los adecuados para un método cuantitativo con  $E=86\%$  y  $R^2=0.989$ . Las muestras

anteriormente analizadas por cPCR, se analizaron de nueva cuenta por el método de qPCR, mostrando un nivel de incidencia diferente al obtenido por cPCR con 100%, 95% y 45%, para tallo, hoja y raíz, respectivamente, evidenciando así la mayor sensibilidad de detección del análisis de qPCR. El tallo fue el órgano que presentó la mayor concentración de CLs con un promedio de  $4 \times 10^8$  copias/ $\mu$ L, el análisis estadístico de  $\chi^2$  indica que la concentración de *Candidatus Liberibacter solanacearum* no es homogénea en los diferentes órganos analizados ( $p > 0.001$ ), en otras palabras aunque el patógeno es ubicuo durante un intervalo de tiempo (36 días), la concentración no es uniforme a través del tiempo. Actualmente no existe información de la distribución cuantitativa heterogénea del patógeno *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los órganos de la planta de tomate específicamente, Sin embargo, en estudios similares se ha sugerido que en el floema la concentración del patógeno puede incrementarse debido a que las condiciones de crecimiento son más favorables, además el patógeno podría aprovechar el sistema de transporte y asimilación de nutrientes de la planta explicando así su acumulación en la parte apical de la planta. Otra posible consecuencia es el gran incremento de carbohidratos solubles que viajan a través del floema mientras que en raíz la biodisponibilidad de este nutriente se ve reducido. Con base en estos resultados se recomienda realizar el muestreo del tallo de la planta de tomate, y no de los brotes nuevos como anteriormente se realizaba, ya que aquí se encuentra la mayor concentración de CLs y presenta el mayor porcentaje de incidencia por cPCR; además se podría utilizar el método estandarizado en el presente trabajo para aumentar la precisión del diagnóstico de CLs sobre todo en las etapas iniciales de la infección. Esta información puede contribuir al diseño de una estrategia de detección temprana del patógeno dentro de un manejo integral de calidad de hortalizas afectadas con dicho patógeno.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, *Solanum lycopersicum*  
L

## ABSTRACT

The “permanente de tomate”, “punta morada” of the potato or zebra chips and chlorosis buds in chili are currently classified as diseases of great importance because of the economic losses they cause to the crops of the main tomato producing areas (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) and chile (*Capsicum annuum*) in Central and North America and New Zealand. These diseases are caused by the bacterium-like organism (OTB) *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLs), a gram-negative, phloem-restricted alphaproteobacteria, a non-culturable secondary endosymbiont that is propagated by the potato / tomato psyllid *Bactericera cockerelli* feeding process. The absence of curative procedures makes it difficult to control these diseases in such a way that prevention is the most viable strategy. In addition, the complex environment in which the bacteria interact with the hosts has made their control difficult and represents one of the causes of the limited success in the management of the disease, thus, it is important to know characteristics such as the distribution and concentration of the pathogen within the host are determinants to understand their behavior. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of time in the distribution of *Candidatus Liberibacter solanacearum* on the root, stem and leaf of the *Solanum lycopersicum* L plant by the real-time polymerase chain reaction (qPCR). A bioassay was designed for the evaluation of the effect of CLs on tomato plants of the V305 variety through direct transmission by psyllid, *Bactericera cockerelli* were allow to feed for a period of 72 hours, then 5 destructive samples were made every 14 days from 3 different organs in the plant (root, stem and leaf) in quadruplicate. During this period, it was supervised the symptoms of “permanente de tomate” and detection of CLs by conventional PCR (cPCR) was monitored, finally the qPCR quantification methodology was standardized by designing oligonucleotides for the 16S DNA ribosomal gene (rDNA) of CLs and evaluating the methodology as reaction efficiency, linearity range and method specificity. The symptoms of “permanente del tomate” were developed until 56 days, showing progressive damage through the time and develop symptoms such as flower abortion, reduced leaflets, rolled and brittle leaves, apical chlorosis, darkening at base of stem and root. The incidence of CLs in cPCR was found mostly in stem (80%) with the exception of the first sampling (14 days), while the lowest frequency of the pathogen was recorded in the root (20%), while the samples of sheet show an incidence of 28%. On the other hand, the oligonucleotides designed for qPCR were specific with a  $T_m$  of 82.64 ° C and absence of secondary amplifications. The efficiency and linearity of the reaction were sufficient for a quantitative method with  $E = 86\%$  and  $R^2 = 0.989$ . The previous samples analyzed by cPCR were analyzed again by the qPCR method, showing a level of infraction different from that obtained by cPCR with 100%, 95% and 45%, for stem, leaf and root, respectively, thus evidencing the mayor detection sensitivity

of the qPCR analysis. The stem was the organ that presented the highest concentration of CLs with an average of  $4 \times 10^8$  copies /  $\mu\text{L}$ , the statistical analysis of  $\chi^2$  indicates that the concentration of *Candidatus Liberibacter solanacearum* is not homogeneous in the different organs analyzed ( $p > 0.001$ ), in others words the pathogen is ubiquitous for a period of time (36 days), the concentration is not uniform over time. Nowadays, there is no information on the heterogeneous quantitative distribution of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* in the organs of the tomato plant specifically. However, in similar studies it has been suggested that in the phloem the concentration of the pathogen may increase due to the growth conditions are available, in addition the pathogen could take advantage of the system of transport and assimilation of nutrients of the plant explaining accumulation in the apical part of the plant. Another possible consequence is the large increase in soluble carbohydrates that travel through the phloem while at the root the bioavailability of this nutrient is reduced. Based on these results, it is recommended to carry out the sampling of the stem of the tomato plant, and not of the new shoots as previously was done, since here the highest concentration of CLs is found and it has the highest percentage of incidence by cPCR; In addition, the standardized method could be used in this work to increase the accuracy of the diagnosis of CLs, especially in the initial stages of infection. This information can contribute to the design of an early pathogen detection strategy within an integral quality management of vegetables affected with said pathogen.

Key words: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, *Solanum lycopersicum* L

## II. INTRODUCCIÓN

Los cultivos hortícolas son afectados por una gran cantidad de factores que limitan su producción y calidad, entre los que sobresalen los insectos, nematodos, malezas y enfermedades de tipo fúngicas, bacterianas, virosas, fitoplasmas u organismos tipo bacteria. Una de las principales enfermedades en papa conocida como “punta morada de la papa” (PMP) es considerada de gran importancia por las pérdidas económicas que ocasiona y la cual se encuentra distribuida en Canadá, E.U.A., Centro, Sudamérica y en México (Garzón, 2010; Leyva y col, 2002).

El nombre de la enfermedad punta morada de la papa se debe a la coloración morada que adquieren las hojas apicales, síntoma que está asociado con enanismo en la planta y enrollamiento de las hojas. Recientemente se han descrito síntomas adicionales que se caracterizan por una coloración oscura interna de los tubérculos y ausencia de brotación de los mismos; esta enfermedad se conoce como “Zebra chips” (ZC) y causa mayores daños que la comúnmente conocida “Punta morada” ya que actualmente está afectando el 50% de la superficie nacional y sobre la cual se ha descrito a *B. cockerelli* como vector (Garzón, 2010).

Al igual que en papa, la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L) es afectada por una enfermedad que causó un 60% de daños en la producción de tomate en Guanajuato, a la que se llamó “permanente del tomate” (PT), cuyos

síntomas son hojas quebradizas y enrolladas, aborto de flor, sobrebrotación de yemas axilares, frutos muy pequeños y por lo tanto no comerciales, enanismo y decaimiento general de la planta (Garzón, 2010). Actualmente se conoce que la enfermedad es transmitida por un insecto llamado vulgarmente como pulgón saltador y de nombre científico como *Bactericera cockerelli* (Garzón, 2010)

*Bactericera cockerelli* es conocido como el psílido de la papa y/o tomate, debido a que es uno de los insectos plagas más importantes de estos cultivos en grandes áreas agrícolas de América del Norte. En México se localiza en al menos 16 estados de la república atacando los diferentes cultivos hortícolas (García, 2007). Este insecto pertenece a la orden hemiptera de la familia de los psílidos, cuyo ciclo biológico comprende 7 etapas (Huevecillo, Estadio ninfal 1,2,3,4 y 5, y adulto) (Marín y col, 1995). Además, es un insecto poiquilotermo, es decir, que su velocidad de desarrollo está determinada en gran parte por la temperatura (List, 1939); cabe mencionar que tiene afinidad por diversas especies de cultivos hortícolas pertenecientes a la familia de las solanáceas, por lo tanto, puede ser calificado como un insecto polífago (García, 2007)

El insecto causa dos tipos de daño en la planta, el primero conocido como daño directo que es toxinífero, y el segundo es indirecto, por la transmisión de organismos tipo fitoplasma o bacteria (Garzón y col, 2005). A los daños toxiníferos se atribuye el amarillamiento de la planta en papa y se encuentra

relacionado a los procesos de alimentación de las ninfas de *Bactericera* en el vegetal (Richards y col, 1933).

Estudios recientes han informado sobre una nueva especie de bacteria no cultivable denominada *Candidatus Liberibacter solanacearum (psyllaorous)* (Liefting y col. 2008; Hansen y col. 2008), que es responsable de la enfermedad permanente del tomate (Garzón y col. 2009), y de la enfermedad Zebra chips (Secor y col. 2009) que es transmitida por *Bactericera cockerelli* (Munyaneza y col. 2007).

La detección de bacterias del género *Candidatus Liberibacter* es complicada debido a que no son cultivables en medios sólidos, por lo que la información que se tiene acerca de su etiología, fisiología general y modo de patogénesis es muy deficiente (Hong y col. 2011). Sin embargo, las técnicas de biología molecular actualmente ofrecen la estrategia de detección para estas condiciones mediante secuenciación del rARN 16S; detectando pequeños cambios de nucleótidos en las regiones variables de este gen es posible organizar filogenéticamente cada una de las bacterias no cultivables (Mendoza, 2004).

La detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* principalmente se ha realizado por cPCR con los oligonucleótidos específicos AO2/OI2c (Liefting y col. 2009). Sin embargo, se ha observado que el patógeno se encuentra ausente en algunas muestras de plantas de tomate (dato no reportado) y



árboles de cítricos sintomáticas para la enfermedades del permanente de tomate y huanglongbing (HLB), respectivamente, lo que sugiere que dichas muestras se encuentran libres de *Liberibacter* y a su vez indica una distribución no homogénea del patógeno en el organismo o bien la concentración de *Liberibacter* en estas muestras es demasiada baja para poder ser detectado por cPCR (Teixeira y col. 2008).

Como consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue determinar la distribución de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los diferentes órganos de la planta de tomate a través del tiempo y su cuantificación por qPCR, permitiendo con ello conocer si la distribución del patógeno es homogénea en la planta. Para ello se utilizó la técnica de qPCR que ha demostrado ser altamente sensible en comparación con cPCR (Schmittgena y col. 2000) al detectar hasta 10 copias de genoma de *Candidatus Liberibacter solanacearum* por cada gramo de tejido infectado (Wenbin y col. 2009).

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### A. *BACTERICERA COCKERELLI* SULC.

*Bactericera (Paratrioza) cockerelli* es un insecto que pertenece al orden Hemiptera; sub-orden Sternorrhyncha; superfamilia Psylloidea y la familia, Psyllidae, por lo que se le conoce también con el nombre de psílido, y que junto con las familias *Cicadellidae* y *Fulgoridae*, se han descrito como vectores de procariontes (Janes, 1936).

Inicialmente fue denominado como *Paratrioza cockerelli*, comúnmente llamado pulgón saltador por su semejanza con los pulgones, o bien salerillo por las heces fecales que deja en las plantas. Este insecto también es conocido como el psílido de la papa y/o tomate, debido a que es uno de los insectos plagas más importantes de estos cultivos en grandes áreas agrícolas de Norte América. Primeramente, fue una amenaza para los cultivos de papa regional, seguido por un periodo de dispersión y pérdidas en los años 1920's; aunque se le reconoció como plaga, luego de haber ocasionado cuantiosas pérdidas durante varias temporadas agrícolas (Cranshaw, 1994). Richards desde 1928 describió una nueva enfermedad de papa ocasionada por *B. cockerelli* que apareció repentinamente en 1927 y que llegó a ser un problema sobresaliente en los diferentes estados de los E.U.A.

## 1. Origen

Se considera que *B. cockerelli* es posiblemente originaria del oeste de los E.U.A., y fue descubierta como una plaga importante en cultivares de papa en Colorado por Cockerelli y reportada como una nueva especie (Sulc, 1909); su nombre genérico ha cambiado con el paso del tiempo, primeramente, se le llamó *Trioza cockerelli*, después recibió los nombres *Sinitrioza*, *Allotrioza*, *Paratrioza*, *Eubactericera* y hoy en día, se la ubica como *Bactericera cockerelli* (Burckhardt y Lauterer, 1997). *B. cockerelli* se ha observado con mayor frecuencia desde 1947, y actualmente se ha convertido uno de los insectos plaga con mayor impacto económico de los cultivos de chile, papa y tomate, en los estados de Guanajuato, Durango, Estado de México y Coahuila. Actualmente se localiza en al menos 16 estados de la república atacando los diferentes cultivos hortícolas (García, 2007)

## 2. Biología y Ciclo de vida

Este insecto se alimenta de la savia (floema) de sus hospederos con su aparato bucal de tipo picador chupador. El insecto pasa por una metamorfosis hemimetábola: huevo, ninfa y adulto (García, 2007).

El ciclo biológico de *Bactericera Cockerelli Sulc* presenta un periodo de incubación de 3 a 15 días y la totalidad del desarrollo ninfal de 14 a 17 días; después de la eclosión, la ninfa pasa por 5 instares requiriendo de 1 a 5 días, 1 a 4 días, 1 a 5 días y de 3 a 9 días respectivamente. Se necesita aproximadamente de 30 días desde la copulación hasta el adulto, además el sexo en 127 individuos fueron de 62 machos y 65 hembras dando una proporción aproximada de 1:1 (Knowlton y col, 1931).

Por otra parte, es un insecto tipo poiquilotermo, es decir, que su velocidad de desarrollo está determinada en gran parte por la temperatura, su edad fisiológica debe definirse en base a grados día o unidades de calor (Cuadro 1). Su ciclo biológico bajo las condiciones anteriores de desarrollo se completó de huevecillos a adulto en 356 unidades calor ( $T^{\circ}\text{C}$  mínima +  $T^{\circ}\text{C}$  máxima / 2-7 $^{\circ}\text{C}$ ) (Marín, 1995).

### **3. Características morfológicas y taxonómicas.**

#### **a. Huevecillos**

Miden de 0.44 mm de largo y 0.2 mm de ancho, estos son de forma ovoide, su coloración es variable pueden ser color anaranjado o amarillento brillante, presentan en uno de sus extremos una coloración naranja y en este un pedicelo con el cual se adhieren a las hojas (Buckner, 2002) (Fig. 1A).

**Cuadro 1.** Relación de ciclo de vida y unidades de calor para *Bactericera cockerelli*.

<b>Estado biológico</b>	<b>UC</b>
Huevecillo – Primer Instar	71.72
Primero – Segundo Instar	53.68
Segundo – Tercer Instar	47.58
Tercero – Cuarto Instar	54.40
Cuarto – Quinto Instar	47.92
Quinto – Adultos	80.51
Total	355.81

## **b. Ninfas**

- Primer instar. Son de color naranja, presentan antenas con los segmentos basales cortos y gruesos, los cuales se adelgazan hasta finalizar en un pequeño segmento con dos setas sensoras; los ojos son de color rojo o naranja. Durante este instar no se observan paquetes alares; las patas presentan una segmentación poco visible al igual que el abdomen.
- Segundo Instar. Se observa claramente la constricción entre el cuerpo, cabeza y abdomen. La cabeza es de color amarillento, las antenas son filiformes con un par de setas sensores en la parte apical, los ojos son de color anaranjado oscuro, el tórax es de color verde amarillento, se observan los paquetes alares, se presenta la segmentación en las patas. Tanto tórax y abdomen son de mayor tamaño, así como las estructuras en cada uno de ellos. El abdomen es de color amarillo y presenta un par de espiráculos en los cuatro primeros segmentos.
- Tercer Instar. Se definen perfectamente las constricciones del cuerpo, la cabeza es de color amarillo, las antenas se adelgazan en la parte media para terminar con dos setas sensoras; la coloración de los ojos es rojiza, se observa en el tórax con mucha facilidad los dos pares de alas en el mesotórax y metatórax; este es de color verde amarillento, el abdomen es de color amarillo y es más redondo inmediatamente abajo del segundo par de alas.

- Cuarto Instar. La cabeza es de color amarillo, los ojos son de color rojo oscuro, las antenas continúan con las mismas características, la segmentación de las patas se encontró tan definida que se puede apreciar en la parte terminal de las tibias posteriores tres espuelas, así como dos segmentos tarsales y un par de uñas.
- Quinto Instar. La cabeza y abdomen son de color verde claro, el tórax con una tonalidad más oscura, las antenas están divididas en dos partes por una hendidura muy marcada la parte basal es gruesa y la apical es filiforme. Presenta seis placoides sencillas muy visibles; los ojos se tornan de color guinda, presentan tres espuelas en la parte terminal de las tibias posteriores y dos segmentos dorsales y un par de uñas, el abdomen es de forma semicircular.

### **c. Adultos**

*B. cockerelli* en el estado adulto mide 2 mm aproximadamente, muy similar a los pulgones sin cornículos o sifunculos de ahí su nombre común de pulgón saltador, presenta una coloración oscura y una línea blanca rodeando su cuerpo al principio y al final de su abdomen, en donde presenta líneas oscuras a su alrededor a manera de segmentos, en el tórax presenta líneas blancas a lo largo de su cuerpo, sus antenas son tan largas como la mitad del cuerpo y oscuras, posee cuatro alas transparentes formando un tejado sobre su abdomen, su aparato bucal es

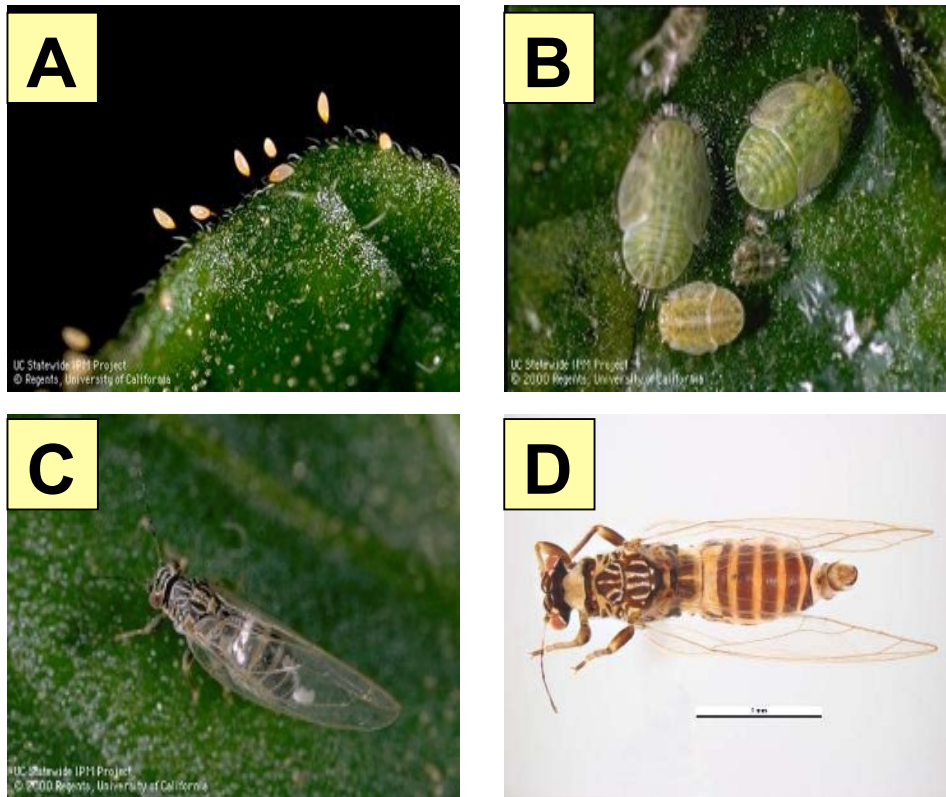
un pico corto de tres segmentos que parece salir de las patas delanteras (Figura 1C y 1D). Presentan dimorfismo sexual, los machos poseen seis segmentos abdominales, más el segmento genital, con estructuras similares a pinzas y las hembras poseen cinco segmentos, más el segmento genital, con una "Y" en el dorso y con abdomen de mayor tamaño que los machos (Cranshaw, 1994).

Recién emergidos son de color verde amarillento con las alas blancas, permanecen emergidos durante las primeras tres o cuatro horas tornándose las alas durante este tiempo en incoloras o transparentes, la cabeza y tórax cambian de color y son amarillo ámbar, posteriormente a café claro hasta llegar a café oscuro o negro. Estos cambios de coloración se presentan entre los 7 y los 10 días (160 a 220 unidades de calor), considerando que la coloración oscura es característica de aquellos insectos que ya copularon (Garzón, 2010).

#### **4. Distribución Geográfica**

*B. cockerelli* es nativo del Norte de América y se encuentra principalmente en regiones de montañas rocosas en la región de Estados Unidos de América y Canadá, desde Colorado, Nuevo México, Arizona, y Nevada, Norte de Utah, Wyoming, Idaho, Montan, Alberta y Saskatchewan. Este insecto plaga es comúnmente encontrado en el sureste y oeste de Texas, así como también ha sido documentado en Oklahoma, Kansas, Nebraska,





**Figura 1.** Morfología de *Bactericera cockerelli*. **A**, Huevecillos colocados por el borde la hoja de una planta. **B**, Diferentes estadios ninfales formando grupos sobre una hoja de planta. **C y D**, Adultos de *B. cockerelli*. (PaDIL, 2015; California, 2015)

Dakota del sur, Dakota del norte, Minnesota, California y Columbia Británica, Recientemente existen reportes de *B. cockerelli* en Washington y Oregón. Accidentalmente el psílido fue introducido en Nueva Zelanda, aparentemente en el año 2000 aproximadamente, y ahora se encuentra establecido en el norte y sur de la isla, donde causa daños considerablemente devastadores para papa, tomate, chile y tamarillo. Aun no es claro como el insecto llegó a Nueva Zelanda; Sin embargo, se ha sugerido que fue introducido a partir del este de los Estados Unidos, probablemente a través de del contrabando de plantas de producción primaria. El psílido de la papa también es encontrado en México, Centro América, incluyendo Guatemala y Honduras (Rehman y col. 2010; Secor y col. 2004).

En las regiones de México se ha encontrado en los últimos años en Coahuila, Chihuahua, Durango, Baja California Norte, Estado de México, Guanajuato, Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí, Sonora y Sinaloa. También se ha registrado su presencia en la parte sur de la Ciudad de México, Río Frío y Puebla. Se ha observado que el psílido del tomate y/o papa, presenta una gran migración poblacional durante la primavera desde el sureste de Arizona a Colorado, Nebraska y otros estados del noroeste. También se ha reportado que las poblaciones, que se originan ocurren mucho más al sur del sureste de Texas y aún más al sur de la costa este de México (García, 2007; Liu y

col. 2006).

## **5. Hospedantes**

El rango de hospedantes de *B. cockerelli* es muy amplio ya que puede reproducirse y/o hibernar en 20 familias de plantas (Cuadro 2), pero las especies de solanáceas son sus preferidas para su alimentación y reproducción, por lo que se le considera como un insecto polífago (García, 2007).

### **B. Daños Causados por *B. cockerelli*.**

#### **1. Amarillamiento por el psílido**

El psílido de la papa es una de las plagas más destructivas en el hemisferio oeste. En los comienzos *B. cockerelli* fue identificado como una nociva y potencial plaga de insectos, en 1917 fue considerada como una peste menor en Colorado durante muchos años, para el año 1920-1930 *B. cockerelli* fue considerada una plaga destructiva de la papa en muchos de los estados de EUA, a partir de observaciones minuciosas en los cultivos se llegó a la descripción de una nueva enfermedad conocida como “Psyllid yellow” o amarillamiento por el psílido. históricamente el daño extensivo a cultivos de solanáceas en esa época se encuentra asociado con la enfermedad del psyllid yellow. Estas condiciones inducen a desordenes fisiológicos además provoca deformación y distorsión del follaje, detención del crecimiento durante semanas o meses, clorosis en las hojas, aborto del fruto y una menor cantidad y calidad del fruto, se presume que

**Cuadro 2.** Principales hospedantes (Solanáceas) de *B. cockerelli*, en donde se alimenta, reproduce e hiberna.

<b>NOMBRE CIENTÍFICO</b>	<b>NOMBRE COMÚN</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<i>Capsicum Nahum</i>	Chile	Cultivada y Silvestre
<i>Datura metel</i>	Toloache	Silvestre
<i>Datura stramonium</i>	Toloache	Silvestre
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	Cultivada
<i>L. var. Ceriforme</i>	Tomate silvestre	Silvestre
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	Tomate silvestre	Silvestre
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Cultivada
<i>Physalis philadelphica</i>	Tomatillo	Silvestre
<i>Physalis lanceolata</i>	Tomatillo	Cultivada
<i>Physalis francheti</i>	Tomatillo	Cultivada
<i>Physalis floridana</i>	Tomatillo	Silvestre
<i>Physalis ixocarpa</i>	Tomatillo	Cultivada
<i>Solanum carolinense</i>	Fruto	Cultivada y Silvestre
<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora	Silvestre
<i>Solanum rostratum</i>	Mala mujer	Silvestre
<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	Cultivada
<i>Lycium spp.</i>	Frutilla	Silvestre

es causada por una toxina que es transmitida durante la actividad de alimentación del insecto, en especial de las ninfas, sin embargo la naturaleza de esta toxina no se ha demostrado hasta la fecha (Richards y col. 1933). Algunos brotes reportados en los años de 1990 ocurrieron durante el rango de hibernación, entonces se deduce que existe una tendencia migratoria del insecto (Murphy, 2013).

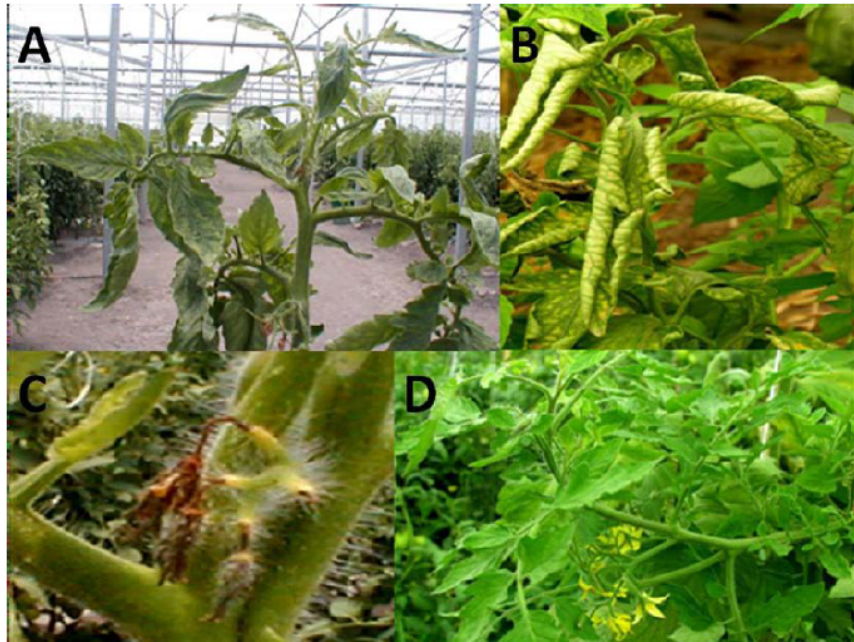
## **2. Permanente del tomate.**

En la región de El Bajío, México, se reportó por primera vez la enfermedad denominada permanente del tomate (PT), la cual causo una pérdida del 60% de los cultivos de tomate en Guanajuato (Garzón, 1984). Es la enfermedad más dañina en las siembras de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del ciclo primavera-verano. Los síntomas en planta son hojas quebradizas y enrolladas, aborto de la flor, exceso de brotes de yemas axiales, frutos muy pequeños y por lo tanto no comercializables, achaparramiento y decaimiento general de la planta. Las manifestaciones comienzan con una clorosis en los brotes apicales, las hojas inferiores se enrollan y presentan una textura quebradiza, de manera normal estas hojas son de color verde intenso y brillante debido a una menor presencia de tricomas en la lámina foliar, posteriormente en las flores se manifiesta una necrosis y son abortadas. La planta es más pequeña y de un color verde más intenso que las normales (Fig. 2) (Garzón, 2010).

El permanente del tomate fue relacionado con *Bactericera cockerelli* por lo cual se tomó como fuente de inóculo y transmitirla en cultivos de tomate en condiciones de invernadero, además de transmitir la enfermedad por injertos exitosamente para así poder establecer que la enfermedad es causada por el vector. Aunque se conocía que *Bactericera cockerelli* era el responsable de dicha enfermedad, se creía que este transmitía un fitoplasma (García, 2007), sin embargo, esto fue descartado posteriormente al alinear la secuencia del genoma del patógeno reportado por Garzón *et al* con el genoma de un organismo tipo bacteria almacenado en la bases de datos de NCBI (Garzón y col, 2009).

### **1. Enfermedad del manchado de la papa “Zebra Chips”**

La enfermedad del manchado de la papa fue registrada por primera vez en cultivos alrededor de Saltillo, México en el año de 1994, y en Estados Unidos de América (EUA) fue identificado por primera vez en el año 2000 en cultivos de papa comercial en el estado de Pearsall y Lower Rio Grande Valley Texas (Secor y col. 2004)



**Figura 2.** Sintomatología en plantas de tomate causadas por la enfermedad PT. A) Planta con decaimiento. B) Hojas enrolladas hacia arriba. C) Aborto de flor por necrosis. D) Exceso de brotes de yemas axiales.

A partir de este año la enfermedad del manchado de la papa o zebra chips (ZC) se ha observado en otros estados, incluyendo Nebraska, Colorado, Kansas, Nuevo México, Arizona, Nevada y California. Este defecto en los tubérculos ha cobrado esporádicamente importancia económica desde el año 2004-2006 e incrementa en cada temporada, además causa pérdidas económicas de millones de dólares tanto para los productores como procesadores en diversas localizaciones en los EUA y México, frecuentemente el defecto en el tubérculo conlleva al abandono de los cultivos (Flores y col, 2004; Secor y col, 2004; Hernández y col, 2006).

Las plantas con infección de ZC presentan un amplio rango de síntomas que son semejantes a la enfermedad de la punta morada de la papa (Fig 3), este último ya ha sido identificado su agente causal como un organismo tipo fitoplasma y que es transmitida por el vector saltamontes de la remolacha (*Circulifer tenellus*) (Lee y col. 2004 y 2006) Además los cambios fisiológicos en las plantas son semejantes a aquellos presentes en la enfermedad del amarillamiento por el psílido los síntomas incluyen retraso en el crecimiento, clorosis, entrenudos hinchados del crecimiento superior, proliferación de yemas axiales y tubérculos aéreos, oscurecimiento del sistema vascular en porciones del tallo inferior, enrollamiento de las hojas y decaimiento temprano de la planta (Cranshaw, 1994; Richards y col. 1933) .



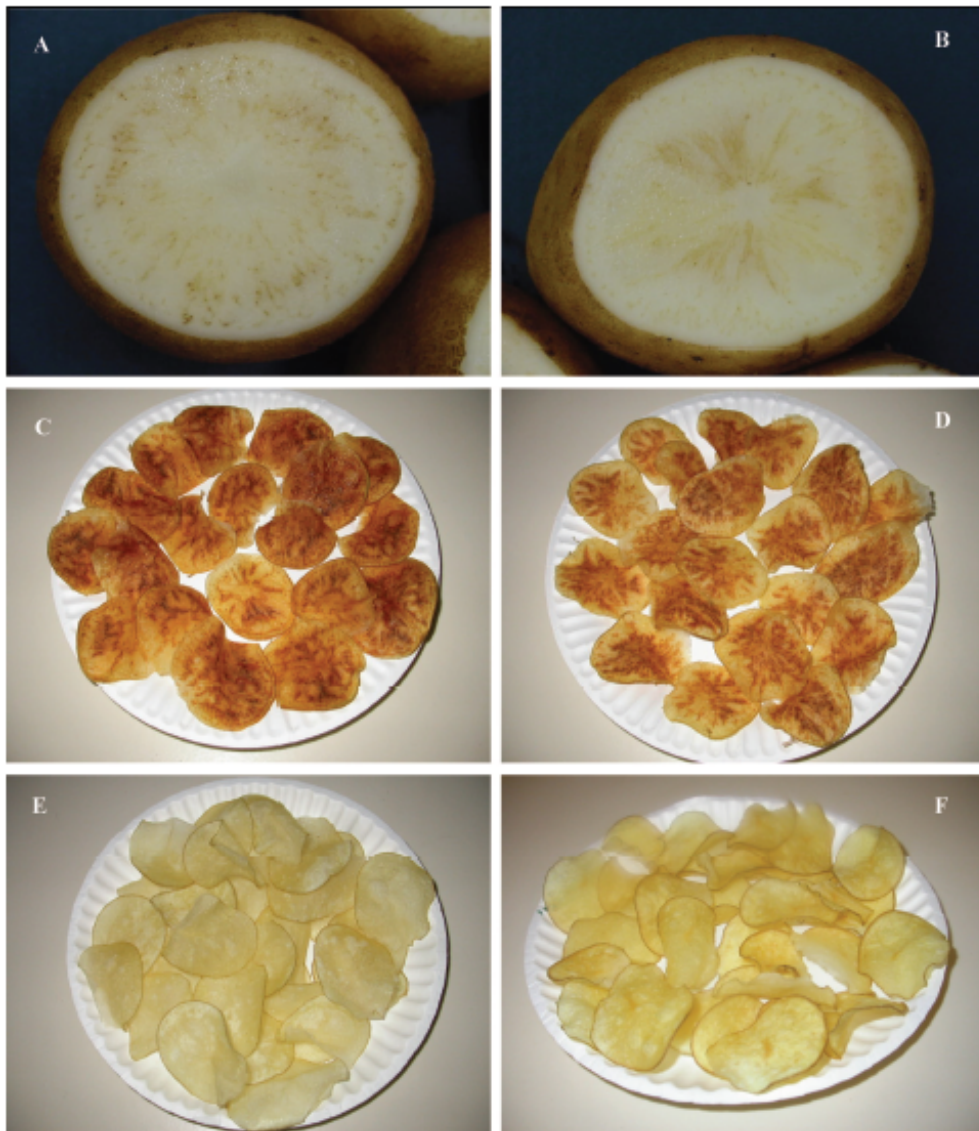
Los síntomas en el tubérculo de ZC incluyen alargamiento de lenticelas del tallo subterráneo, colapso de los estolones, decoloración del anillo vascular y moteado necrótico de los tejidos internos, además ocasionalmente rayas de los tejidos medulares (Gudmestad y col. 2007). Estos síntomas afectan por completo al tubérculo desde el final del tallo hasta la punta del brote. Las frituras hechas a partir de los tubérculos con los síntomas arriba mencionados potencian las características presentando un oscurecimiento severo con rayas color marrón, por esta razón la enfermedad es denominada Zebra Chip (Fig. 4).

La hipótesis de que la enfermedad zebra chips es transmitida por el vector *Paratrioza cockerelli* fue demostrada llevando a cabo experimentos en campo e invernadero en presencia y ausencia del insecto, encontrando estrecha relación de la sintomatología con el insecto, sin embargo, el agente causal se desconocía hasta ese momento (Munyaneza y col. 2007).

El agente causal de todas las enfermedades anteriormente descritas se desarrolla por la presencia de un organismo tipo bacteria encontrado en floema, el cual puede ser detectado por microscopia electrónica y PCR punto final, dicha bacteria pertenece a la familia de las Liberibacter, y puede ser transmitida por el proceso de alimentación de *Bactericera cockerelli* y por injertos (Secory col. 2009; Liefting y col. 2007; Nachappa y col. 2001).



**Figura 3.** Planta de papa con síntomas de punta morada.



**Figura 4.** A-B. Tubérculo de la papa con síntomas de manchado de la papa. C-D, Frituras de la papa con ZC, oscurecimiento del tubérculo y rayado color marrón; E-F, Frituras de tubérculo de papa sana.

### **C. Bacterias del genero *Candidatus Liberibacter*.**

Las bacterias agrupadas dentro del género *Candidatus Liberibacter*, colonizan el floema de sus plantas hospedantes y su imposibilidad para cultivarlas ha dificultado su ubicación taxonómica y por tanto se mantienen bajo la condición de *Candidatus*, término que antecede al género y especie debido a que no se puede tener en una colección biológica. Estas bacterias han sido asociadas con la enfermedad Huanglongbing que afecta a los cítricos cuyo significado en español es “Dragón Amarillo”. La bacteria fue observada por primera vez en 1970 afectando el floema de las hojas de naranja en africa y recientemente se han encontrado en muestras procedentes de São Paulo, Brazil (Lafleche, 1970; Bové, 2005), enfermedad que en ese entonces se consideró que era inducida por un organismo tipo micoplasma.

*Candidatus Liberibacter* es una bacteria Gram-negativa no cultivable que se aloja en los vasos conductores de savia o floema de algunos géneros de las rutáceas y solanáceas (Garnier y col. 1984). Su tamaño varía de 350-550 x 600-1500 nm y un grosor de 20-25 nm. Generalmente son cuerpos en forma de barras y pleomórficos durante su crecimiento (Ver Fig. 5) (Batool y col. 2007; Tanaka y col. 2007). Su caracterización bioquímica es nula, dada la dificultad para aislarla en medio de cultivo puro. La microscopía electrónica y técnicas citoquímicas, han revelado que la bacteria *Candidatus Liberibacter*, está rodeada por una membrana celular compuesta de peptidoglicano, típica de bacterias gram negativas (Garnier y col. 1984). Después de comparar su

secuencia de nucleótidos con otras bacterias registradas en el GenBank, se propuso como miembro de las *Eubacterias* (Jagoueix y col. 1994) Estos investigadores propusieron que el organismo que causa el huanglongbing fuera considerado como bacteria, y que los organismos de este nuevo grupo de la división de las *Proteobacterias*, deberían de recibir el nombre de “Liberibacter” (del latín *liber* [corteza] y *bacter* [ bacteria]. Actualmente se han identificado 4 especies pertenecientes a la familia Liberibacter, 3 bacterias para la enfermedad de los cítricos llamados *Candidatus* Liberibacter asiaticus, *Candidatus* Liberibacter africanus y *Candidatus* Liberibacter americanus (Texeira, 2005; Jagoueix y col. 1996; Hung y col. 2004) y 1 bacteria para la enfermedad en solanáceas nombrada *Candidatus* Liberibacter solanacearum (Liefting y col, 2008), transmitidas por *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* en huanglongbing así como *Bactericera cockelli* para zebra chip.

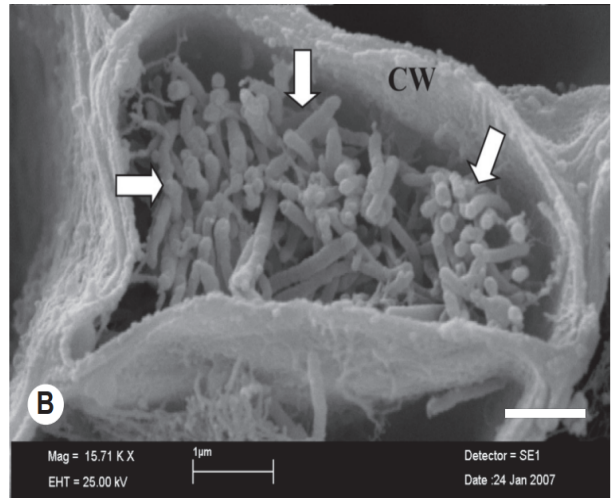
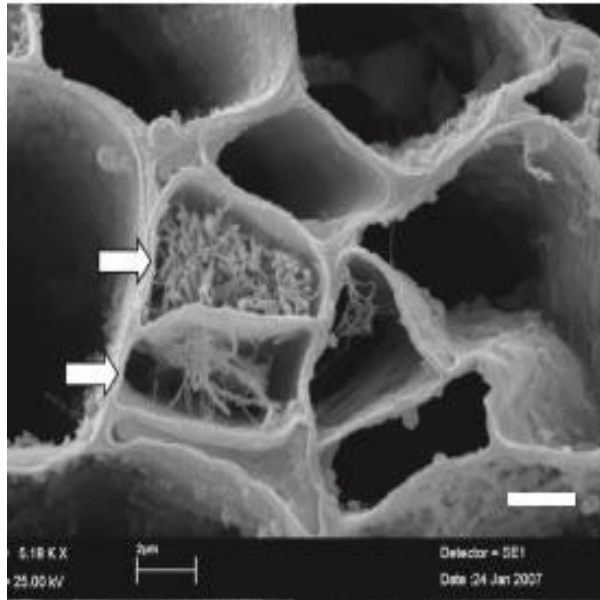
*Bactericera cockerelli* el insecto polífago que se alimenta del floema de una amplia variedad de especies de plantas en las que se encuentra papa y chile, se reporta que la secreción de la saliva de *B. cockerelli*, debilita al hospedero e induce el síntoma de “yellow psilid” (Richards y col. 1933). El desorden de “yellow psilid”, anteriormente fue atribuido a una reacción de la planta, como resultado de las secreciones inyectadas cuando el psílido se alimentaba. Los avances actuales en las técnicas de microbiología celular han permitido detectar que “yellow psilid” y “zebra chips” son dos enfermedades distintas,

siendo la segunda causada por *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Aguilar y col. 2009)

### **1. *Candidatus Liberibacter solanacearum***

*Candidatus Liberibacter solanacearum* es una nueva cepa de *Candidatus Liberibacter* cuyo nombre específico se refiere a la familia de plantas de donde fue aislada. Análisis de microscopía de transmisión electrónica revelaron que miden entre 0.2  $\mu\text{m}$  de ancho y 4  $\mu\text{m}$  de longitud (Liefting y col. 2009). Existen varios reportes que de acuerdo con la sintomatología confirman la presencia de la bacteria anteriormente identificada como fitoplasma y OTB en plantas de tomate, papa y recientemente en Chile, estudios en los que además se identifica *Bactericera cockerelli* (Sulc) como el vector que transmite el patógeno (Garzón, 1984; 2002 y 2009)

*Candidatus Liberibacter solanacearum* es una *alfaproteobacteria*, restringida al floema, endosimbionte secundario no cultivable (Secor y col. 2009). En el año 2010 se reportó por primera vez el genoma completo de *Candidatus Liberibacter solanacearum* que es transmitida por el psílido vector *Bactericera cockerelli* Sulc que se alimenta del floema de las plantas. Investigaciones sobre esta enfermedad se han visto obstaculizada por la falta de métodos de cultivo sólido, Sin embargo, se ha determinado que la secuencia del metagenoma es de 1.26 Mpb de CLs, basado en DNA de psílicos de la papa (Hong y col. 2011).

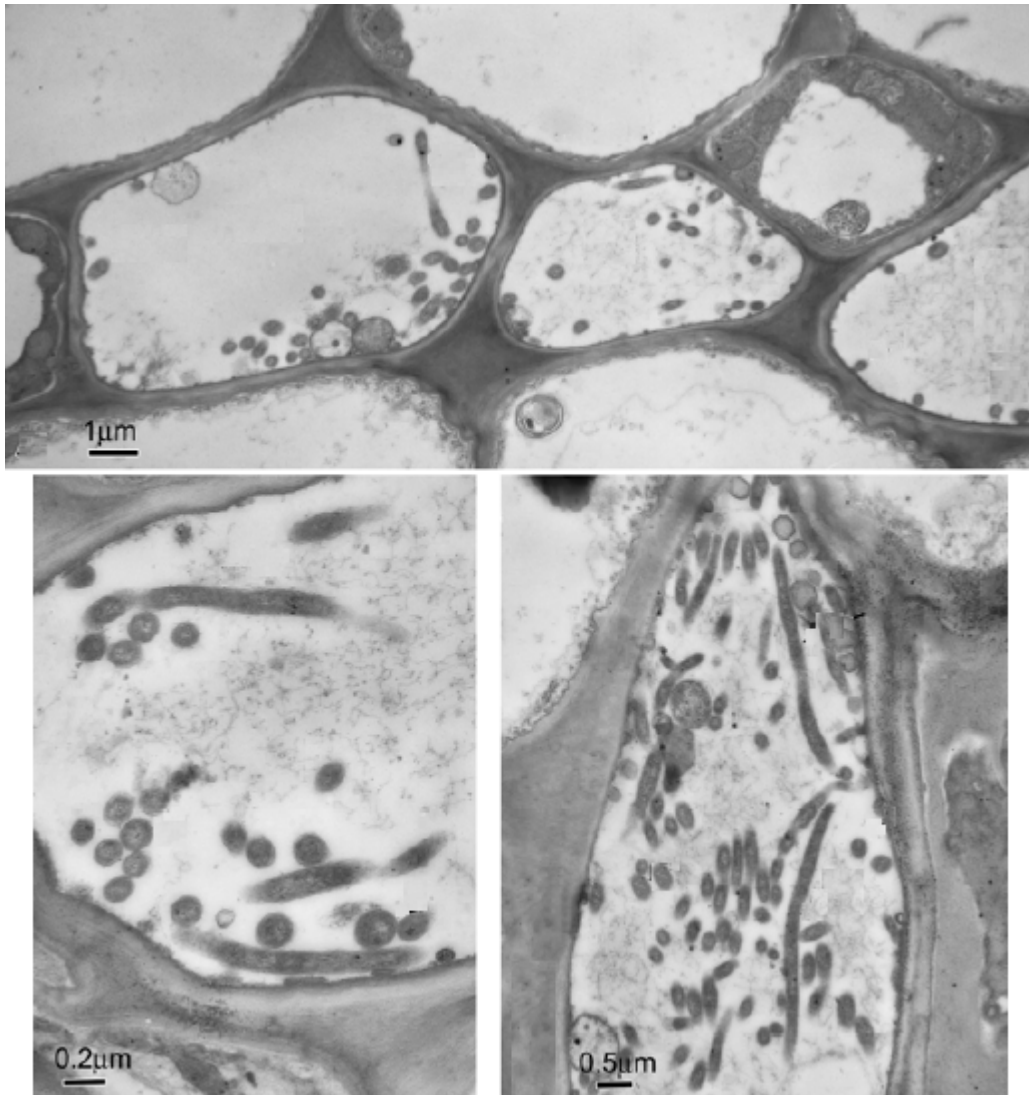


**Figura 5.** A) Microfotografía electrónica de los conductos del floema en una sección transversal de una vena de hoja fracturada por congelación de (*Catharanthus roseus*) infectada experimentalmente por *Candidatus Liberibacter americanus*. Uno de los vasos del floema está colonizado por bacterias baciliformes (barra= 2µm). B) Zoom de la imagen A (barra 1=µm)

CLs no es la única especie de *Liberibacter* que está asociada a enfermedades de plantas. Existen tres especies de *Liberibacter* filogenéticamente distintas (Lin H y col. 2009) que están asociadas con el huanglongbing o enfermedad de los cítricos. El genoma de CLas (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) ha sido secuenciado y registrado (Tyler y col. 2009). Así mismo, debido a que las especies de *Liberibacter* no son cultivables, la información que se tiene acerca de su etiología, fisiología general y modo de patogénesis es muy deficiente.

Aunque no se han realizado estudios sobre el efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de la bacteria del género *Liberibacter* en el vector y los hospederos, se ha demostrado que la temperatura tiene efecto significativo sobre el desarrollo de la bacteria en plantas de papa y arboles de cítricos asociados a zebra chips y HLB, respectivamente. Dicha bacteria no tolera temperaturas arriba de 32 °C en arboles de cítricos, mientras que en plantas de papa a temperaturas menores de 17 °C se reduce considerablemente su desarrollo; el óptimo desarrollo de la bacteria y los síntomas en plantas se observan en el rango de 27 a 32 °C, y en periodos de 32 a 35 °C y 35 a 40 °C no se identificaron síntomas de la enfermedad ni presencia de la bacteria en la fuente de inóculo (Munyanesa y col. 2001).





**Figura 6.** Microfotografía de transmisión electrónica del floema de plantas de tomate infectadas con CLs (leafing y col., 2009).

## 2. *Bactericera cockerelli* como vector de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

El psílido de la papa adquiere a este organismo tipo bacteria y lo distribuye por la alimentación directa infectando a cultivos de tipo solanáceas los cuales son el tipo de planta preferido para la alimentación y oviposición del insecto (Trumble y col. 2006). Además, se ha demostrado que el organismo tipo bacteria es transmitida de manera vertical en el psílido (Hansen y col. 2008), el cual contribuye a la distribución de la enfermedad entre en regiones geográficas por dispersión o migración, también esto ayuda a mantener a la bacteria en regiones geográficas durante el periodo de hibernación del insecto (Murphy y col. 2013).

Recientemente se ha encontrado a *CLs* en cultivos de zanahoria y su vector es el psílido *Trioza apicalis* esto ha ocurrido en Europa en los países de Finlandia, Suecia y Noruega. Esto contribuye al descubrimiento por primera vez de *CLs* en Europa y en cultivos que no pertenecen a las especies de solanáceas (Munyanza y col. 2010). Subsecuentemente la misma bacteria fue encontrada en España y las Islas Canarias, en donde se sospecha que el posible vector de la bacteria en los cultivos de zanahoria es el psílido *Bactericera trigonica* (Alfaro y col. 2012). Los daños a zanahoria por infección de *Liberibacter* mediante psílido puede causar la pérdida del 100% del cultivo si este no es controlado.

Infecciones mixtas han sido encontradas por *CLs* y fitoplasma, además han sido reportados también en papas y zanahorias (Munyanza y col. 2011)

### **3. Detección y cuantificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum***

#### **a. Detección por PCR punto final**

Los oligonucleótidos utilizados para la detección de *CLs* por PCR convencional son nombrados AO2/O12c; el oligonucleótido directo (AO2) es específico para *CLs* de la región del gen rDNA 16S con secuencia de (5'-GCGCTTATTTTAATAGGAGCGGCA-3') mientras que el reverso (O12c) es una secuencia general para todas las bacterias pertenecientes a la familia de *Liberibacter* con secuencia (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'), como resultado se obtiene un amplicón de 1160 pb (Liefting y col. 2008).

#### **b. Cuantificación de *CLs* en PCR tiempo real.**

La técnica analítica de PCR tiempo real es una variante de la PCR convencional que ha demostrado ser altamente eficiente para la detección temprana de patógenos tanto bacterias, así como fitoplasma (Christensen y col. 2004; Crosslin y col. 2011), en muestras de diferentes campos de estudio tanto clínicas hasta fitopatológicas. Actualmente algunas proteobacterias particularmente de la especie *Candidatus Liberibacter* spp pueden ser cuantificadas por PCR en tiempo real con sondas Taqman, con una gran confiabilidad y sensibilidad alcanzando a amplificar a los patógenos productores de HLB a partir de 20 ng de DNA proveniente de nervaduras centrales de hojas

sintomáticas. Además, la confiabilidad es apreciable ya que es altamente específico para *Candidatus Liberibacter* spp (Wenbin y col. 2006).

Recientemente se desarrolló un método de cuantificación absoluta con sondas Taqman para *Candidatus Liberibacter solanacearum*, el cual es de gran ayuda porque se puede caracterizar el dinamismo de la población de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, así como proveer información sobre estudios etiológicos, parasitológicos y epidemiológicos de una manera rápida, confiable y precisa, porque se puede detectar a CLs a partir de 10 copias de genoma, por lo tanto el límite de detección marca una tendencia favorable, ya que la detección de CLs por PCR convencional no cuenta con la suficiente sensibilidad para la detección temprana en cultivos, como consecuencia se pueden obtener resultados negativos cuando en realidad la bacteria se encuentra presente (Wenbin, 2009).

### **c. Problemas de detección de CLs.**

En nuestro equipo de trabajo de la Universidad autónoma de Sinaloa se utiliza la metodología de detección de CLs planteada por Liefting *et al* (2008), sin embargo se han encontrado inconsistencias en la obtención de resultados positivos para la detección de CLs en plantas de tomate que muestran los síntomas típicos de la enfermedad permanente del tomate (Datos no reportados). Estos resultados son obtenidos a través del DNA que se obtiene de hojas apicales o brotes jóvenes de la misma planta; la inconsistencia de los

resultados puede ser multifactorial, pero cabe mencionar que la presencia de la bacteria en la planta es dependiente de la temperatura de tal manera la probabilidad de una detección positiva disminuye conforme aumenta la temperatura en la que se desarrolla el patógeno (Munyanesa y col. 2011). Otros factores que pueden afectar la detección del patógeno son su concentración en la muestra, falta de distribución homogénea del patógeno en la planta, así como sensibilidad de la metodología (Teixeira y col. 2008; Wenbin y col. 2006), en virtud de lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo generar información sobre la distribución espacio-temporal de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en planta de tomate.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L) y el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) son hortalizas de importancia económico-social en México. Sin embargo, la producción y calidad de ambos es severamente afectada por la bacteria no cultivable *Candidatus Liberibacter solanacearum* transmitida por el psílido *Bactericera cockerelli*. Actualmente se tiene poca información de la interacción y comportamiento del patógeno en el hospedante, lo que resulta fundamental en el proceso de detección del mismo con fines de control y de obtención de variedades de tomate y papa resistentes al patógeno. Por ello, el conocer características como la distribución y concentración del patógeno dentro del hospedante son determinantes para comprender su comportamiento.

## V. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

Conocer la distribución y concentración espacio-temporal de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de *Solanum lycopersicum* L CV V305.

### B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer la colonia del vector *Bactericera cockerelli* y la fuente de inóculo del patógeno *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate.
2. Realizar bioensayo de transmisión de *Candidatus Liberibacter solanacearum* de tomate enfermo a tomate sano.
3. Identificar *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate.
4. Analizar la concentración de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los diferentes órganos durante el desarrollo de *Solanum lycopersicum* L.

## **VI. MATERIALES Y METODOS**

### **A. MATERIALES**

#### **1. Localización del estudio**

El experimento se estableció en la estación experimental de Vilmorin, Inc., la cual se encuentra ubicada en el Km. 8 de la carretera Culiacán-Culiacancito en el poblado de La Higuera, Culiacán, Sinaloa(N. 24° 47' 55" w. 107° 29' 37"), altura sobre el nivel del mar de 30 m. Los experimentos moleculares se realizaron en el laboratorio #19 de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAS en Ciudad Universitaria, Culiacán Rosales, Sinaloa

#### **2. Clima**

De acuerdo a la clasificación de Köppen el clima es descrito como clima subtropical con lluvias invernales, precipitación media anual de 800 mm. La temperatura media anual es de 28 °C, presentándose la máxima de 45 °C en el verano, y la mínima de 4 °C en el invierno. La humedad relativa atmosférica media anual es de 68%, presentándose la máxima de 81% en el mes de septiembre, y la mínima de 51% en el mes de abril.



### **3. Área experimental**

El bioensayo se desarrolló en una cámara de crecimiento del laboratorio de fitopatología del centro de investigación Vilmorin, Inc. Integrando jaulas entomológicas cubierta con organza especiales para psílicos con mangas para el manejo de plantas e insectos. La temperatura de las cámaras fue de 25 °C, la cual es la óptima para el crecimiento del insecto y desarrollo de los síntomas del permanente del tomate (Marín y col, 1995) .

### **4. Establecimiento y cuidado de plantas de tomate.**

#### **a. Germinación de *Solanum lycopersicum* L.**

El hospedero utilizado en el presente ensayo fueron 30 plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad V305, así como 4 plantas como control negativo, las cuales no fueron inoculadas. Las semillas fueron proporcionadas de igual manera por el Dr. Enrique Retes y fueron colocadas individualmente sobre un orificio de 5 cm de profundidad en una charola germinadoras de 200 cavidades, la cual contenía como sustrato una mezcla comercial Kekilla-Vermiculita, una vez colocada una semilla en cada uno de los orificios, estos se cubrieron con la mezcla de sustrato y se regaron con agua corriente. Finalmente la charola fue cubierta de la luz solar hasta que se observó la germinación.

#### **b. Mantenimiento en invernadero de *Solanum lycopersicum* L.**

Finalizada la germinación, la cubierta a la protección solar fue removida de la plántula recién emergida. El riego se realizó dos veces por día (mañana y tarde) a excepción de los días con temperaturas superiores a los 30 °C en los cuales se realizaron tres riegos diarios. A partir del inicio de las hojas verdaderas se inició la fertilización por semana con una mezcla de nitrato de calcio, fosfato de potasio monobásico y sulfato de potasio al 0.5%.

#### **c. Trasplante de *Solanum lycopersicum* L.**

El trasplante consistió en transferir las plantas de las charolas de germinación a contenedores de polietileno de un litro, este se realizó cuando la plántula se encontraba en la etapa de tres hojas verdaderas, donde el tallo es lo suficientemente resistente para manipularse y evitar daño físico. Los contenedores de polietileno se llenaron con la mezcla de sustrato Kekilla-vermiculita-tierra “muerta” húmeda (Suelo de textura limo-arenoso).

#### **d. Condiciones de manejo de *Solanum lycopersicum* L. en cámara bioclimática**

Las plantas trasplantadas fueron colocadas en jaulas entomológicas ubicadas en una cámara climática a temperatura y fotoperiodos controlados, para el caso de este ensayo la temperatura de manutención fue de 25 °C de manera constante las 24 horas y un periodo de 12:12 horas de luz artificial.

### **5. Establecimiento de la colonia *Bactericera cockerelli* y fuente de inóculo *Candidatus Liberibacter solanacearum***

El psílido *Bactericera cockerelli* fue muestreado en el sur de Sinaloa en el año 2015 de acuerdo a la morfología del insecto previamente descrita (Marín y col, 1995). Los insectos fueron colectados de plantas de tomate que en campo presentaban los síntomas del permanente del tomate a partir de los cuales se confirmó la presencia de la bacteria CLs por PCR punto final. Los insectos fueron establecidos en dos ambientes diferentes, el primero de ellos en cámaras climáticas con condiciones controladas de temperatura (25 °C), humedad (60% H.R) y fotoperiodos (12 horas luz; 12 horas oscuridad), y en invernadero con las condiciones ambientales estacionarias, alimentándose de plantas de *Solanum melongena* L. y *Solanum lycopersicum* L con un intercambio constante de estas de entre 30 y 45 días, en las instalaciones de Vilmorin Inc.

## **6. Bioensayo de transmisión de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.**

### **a. Transmisión**

La inoculación del patógeno se realizó por transmisión directa, colocando 10 psílicos *Bactericera cockerelli* por cada una de las 30 plantas las cuales en ese momento ya se encontraban en la jaula entomológica con la ayuda de succionadores entomológicos, además de 4 ejemplares sin inocular que cumplieron la función de control negativo, el periodo de transmisión del patógeno fue realizada por un periodo de 72 horas tiempo suficiente para realizar una transmisión del patógeno de manera eficiente, posteriormente los insectos fueron retirados (Buchman y col, 2011; Rashed, 2012).

### **b. Muestras y monitoreo.**

Se colectó tejido foliar de plantas de tomate durante los diferentes periodos del bioensayo, las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a -20 °C hasta la extracción de ADN y su posterior análisis por PCR. También se colectaron muestras del psílido *Bactericera cockerelli* antes de comenzar con el bioensayo para confirmar que el patógeno *Candidatus Liberibacter solanacearum* se encontrara presente, los psíidos adultos de *Bactericera cockerelli* fueron recolectados con la ayuda de un succionador entomológico y fueron almacenados en tubos de 1.5 mL a la misma temperatura que el tejido foliar.

El bioensayo se desarrolló en periodo de tiempo de 63 días, el muestreo tiene una tabulación de 14 días en el cual se tomaron 4 plantas al azar, y se obtuvieron 3 órganos de cada una de las unidades experimentales, que corresponden a hoja, tallo y raíz, de tal manera que en cada uno de los muestreos se obtuvieron 12 muestras individuales. En cada uno de los muestreos se evaluó si las plantas desarrollaban síntomas del permanente del tomate.

## **B. METODOS**

### **1. PCR punto final**

#### **a. Identificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.**

La identificación de presencia/ausencia del patógeno se realizó en hojas de plantas de tomate que presentaban síntomas de PT, insecto, así como de las plantas que sirvieron como unidades experimentales previamente a la realización del ensayo. Los procedimientos para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* corresponden a lo planteado en el apartado b, c, y d de esta sección.

### **1) Extracción de DNA en plantas e insectos.**

La metodología de extracción de DNA fue mediante el detergente CTAB (Bromuro de Hexadecyltrimetilamonio) en una mezcla que toma por nombre buffer de extracción (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-b mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl pH 8.0), este es un método eficiente para la obtención DNA templado en plantas de tomate e insectos. Primeramente, se trituró la muestra con la ayuda de un mortero y pistilo agregando 800  $\mu$ L del buffer de extracción para planta y 150  $\mu$ L en un tubo eppendorf y barilla trituradora para insecto, la trituración continuó hasta la homogenización del tejido de la planta en el buffer. Posteriormente las muestras fueron colocadas en un baño de agua a 65 °C durante un periodo mínimo de 30 minutos y máximo de 1 hora. Posteriormente se adicionó 1 volumen de la mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1), consecutivamente se homogenizó la muestra por inversión, posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 12 000 rpm a 4 °C, después se recuperó el sobrenadante en un tubo

ependorf de 1.5 mL nuevos y agregó 1 volumen de alcohol isopropílico para que el DNA de la suspensión precipite, para esto se necesitó esperar que el DNA precipitara durante 1 hora a -20 °C o se dejaba reposar durante toda la noche, a continuación fue necesario centrifugar la muestra a 12 000 rpm a 4 °C durante 30 minutos como mínimo, consecutivamente se realizaron 2 lavados con 100-500 µL de etanol al 70% v/v , este volumen es variable al volumen recuperado de DNA, consecutivamente se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12 000 rpm a 4 °C y decantó el etanol. Finalmente, se descartó el etanol de la última centrifugación y dejó que la muestra seque al aire a temperatura ambiente, hasta que el etanol se evaporo por completo para suspender el pellet de DNA en 50 µL de agua grado inyectable (Doyle y Doyle, 1990).

## **2) PCR punto final**

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen de 20 µL en las condiciones que se muestran en el Cuadro 3. En el termociclador C1000™ Thermal Cycler BIO-RAD, la reacción inicio con un precalentamiento de 2 min a 94 °C seguida de 35 ciclos a tres temperaturas: La desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 60°C por 30 s y la extensión a 72 °C por 1 min; por último 10 min a 72 °C. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en el Cuadro 4. Una vez amplificada la región 16S de CLs se procedió a la detección del amplicón por electroforesis en gel de agarosa (Liefing y col, 2008).

### **3) Electroforesis en gel de agarosa**

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.0% preparados con TAE (Tris 40 mM, Ácido acético, EDTA 0.5 M, pH 8.0) y el reactivo de tinción RedGel™. En el primer carril del gel se colocó en paralelo las muestras y un marcador de ADN de peso molecular conocido (1 Kb plus Ladder, Invitrogen®). La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 85 voltios durante 50 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en el fotodocumentador.

## **2. Cuantificación de CLs por PCR tiempo real.**

### **a. Diseño de oligonucleótidos.**

La estandarización de la metodología para cuantificación de CLs por tecnología qPCR-SyBRgreen® requirió de las siguiente fases para llevarse a cabo: diseño de oligonucleótidos, evaluación de oligonucleótidos, obtención de la solución de referencia y elaboración de curva de calibración estándar. Primeramente se diseñó un par de oligonucleótidos con la ayuda de herramientas ofimáticas en

**Cuadro 3. Condiciones de reacción para la amplificación de CLs.**

Componente	Concentración final
ADN	40 ng
Oligonucleótido OA2	0.25 $\mu$ M
Oligonucleótido OI2c	0.25 $\mu$ M
dNTP's	0.2 Mm
MgCl <sub>2</sub>	3 Mm
Taq	1 U
Buffer	1X



**Cuadro 4. Características de los oligonucleótidos en PCR punto final.**

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del amplificado
OA2	GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA	1168 pb
OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	

línea PrimerBLAST con dirección URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> y Oligoanalyzer 3.1 con dirección URL <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> (NCBI, 2016; IDT, 2017) en la cual se insertaron secuencias de CLs propias del laboratorio 19 (Figura 7) (Melgoza, 2016) y se siguieron las especificaciones de diseño recomendadas por diversos autores como temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), porcentaje de pares de bases (%GC) [50-60%], tamaño del amplicón [150-300 pb], así como evitar la complementariedad y posterior formación de dímeros. (Basu y col. 2015; Jian Ye y col. 2012; Bustin y col. 2000).

Una característica crítica en qPCR para tecnología SyBR green es la formación de dímeros que produce una baja eficiencia de la reacción de PCR. y puede generar falsos positivos (Ririe y col. 1997) de tal manera se analizó la compatibilidad de los extremos 3'-5' con la herramienta ofimática en línea Oligoanalyzer 3.1 (IDT, 2016).

#### **a. Evaluación de oligonucleótidos**

La principal variable a evaluar para el correcto funcionamiento del método es la especificidad de los oligonucleótidos, de tal manera que, primeramente se realizó un análisis *in silico* de los oligonucleótidos obtenidos del diseño en donde se buscaron posibles amplicones adicionales al deseado en el genoma de *B. cockerelli*, *Escherichia coli* y el vector pCR™2.1-TOPO®, así como en *S.*

*lycopersicum* L, los 3 genomas corresponden al DNA en el cual se puede encontrar mezclado la región del gen 16S de CLs.

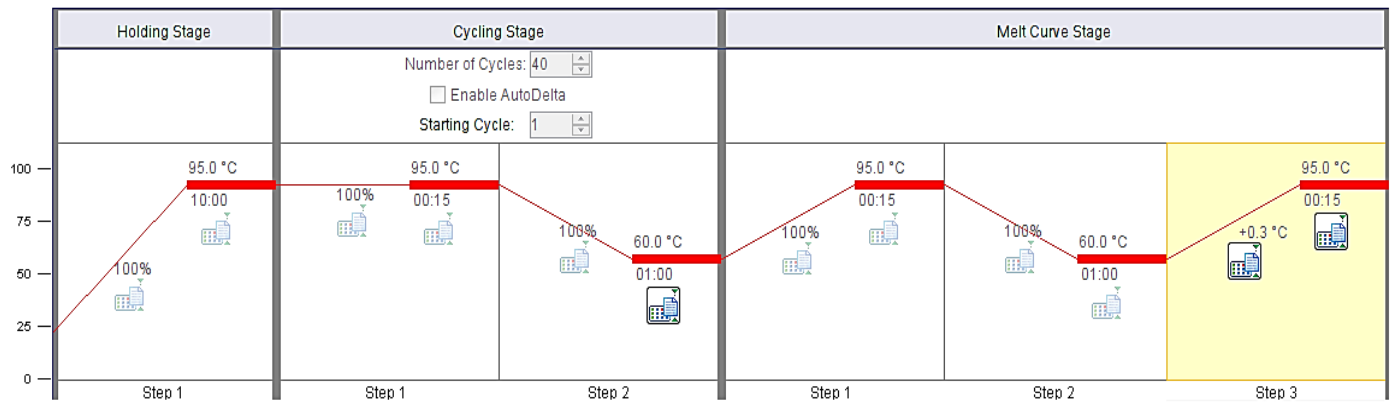
CLONA: 116, pT7-pR, pCR4-TOPO, CD, 09 DE AGOSTO DEL 2011  
SITIO FINAL: EcoRI, AAGGGC + GAATTC, POSICION: 1159-1164 + 1165-1170

```
TTTTTAATAGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTTT
TCTACAGGATAACGCACGGAAACGTGTGCTAATACCGTATACGCCCTGAGA
AGGGGAAAGATTTATTGGAGAGAGATGAGCCCGCGTTAGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCTACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAC
GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCGCCGGAGAAGATAA
TGACGGTATCCGGAGAAGAAGTCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGAAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATAACTGGGCGTAAAGGGCG
CGTAGGCGGGTAATTAAGTTAGGGGTGAAATCCCAAGGCTCAACCTTGGA
ACTGCCTTTAATACTGGTTATCTAGAGTTCAGGAGAGGTGAGTGAATTCC
GAGTGTAGAGGTGAAATTCGCAGATATTCGGAGGACACCAGTGGCGAAGG
CGGCTCACTGGCCTGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAGCTG
TTGGGTGGTTTACCATTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCA
CAGGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACC
AGCCCTTGACATATAGAGGACGATATCAGAGATGGTATTTTCTTTTCGGAG
ACCTTTATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCTCTAGTTGCCATCAAGTT
TAGATTTTATCTAGATGTTGGGTACTTTATAGGGACTGCCGGTGATAATCCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGTGGTTACAATGGGTTGCGAAGTCGCGAGGCAA
GGGCGAATTC
```

Figura 7. Secuencia nucleotídica del gen 16S muestra 116 (Melgoza, 2016).

Adicional al análisis de *In silico*, los oligonucleótidos fueron evaluados por la curva de disociación de qPCR que postula lo siguiente; si la fluorescencia de SYBR Green es monitoreada continuamente a través del ciclo de temperatura, los productos de la desnaturalización se pueden observar como una rápida pérdida en la fluorescencia cercana a la temperatura desnaturalización, los productos de PCR pueden ser distinguidos por sus curvas de disociación, la forma y posición de la curva de disociación se encuentran relacionadas directamente con la proporción de GC/TA, longitud y secuencia del amplicón (Ririe y col. 1997). En otras palabras, la curva de disociación con los fluoróforos SYBR Green confirma una correcta amplificación de la secuencia de interés (Wilhelm, 2003), en la mayoría de los casos, productos no específicos tienen una longitud de pares de bases diferente y un  $T_m$  diferente al de interés.

La curva de disociación fue obtenida de muestras preparadas con la solución de referencia, las cuales fueron elaboradas conforme a lo planteado en la figura 8. Mezcla de la reacción para preparación de muestras problema.



**Figura 8.** Condiciones de termociclador (Cycling stage) para amplificación de gen 16S de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y curva de disociación para la evaluación de formación de dímeros por parte de los oligonucleótidos.

### **3. Obtención de la solución de referencia.**

La solución de referencia utilizada en el presente trabajo fue obtenida a partir de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformada con el gen 16S, el cual fue clonado en el vector pCR™2.1-TOPO®, mediante el procedimiento previamente descrito (Melgoza, 2016).

#### **a. Extracción de DNA plasmídico**

La purificación del vector a partir de *Escherichia coli* se realizó por la técnica de extracción de DNA plasmídico conforme a la metodología previamente descrita (Birnboim y Doly, 1979), la cual consiste en inocular bacterias recombinantes en 5 mL de medio LB- ampicilina (50 mg/ $\mu$ L) e incubar a 37 °C con agitación durante 18 h. El cultivo se centrifugó a 12000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y se conservaron 50-100  $\mu$ L para suspender la pastilla por agitación en vórtex. Se agregaron 100  $\mu$ L de la solución I (Solución Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8 y EDTA 10 mM pH 8) y se agitó en vórtex. Se agregaron 200  $\mu$ L de la solución II (NaOH 0.2 M y SDS 1%) a temperatura ambiente, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ L de la solución III (Acetato de sodio 5 M y ácido acético 3M pH 5.2) fría y se mezcló suavemente por 10 s y se incubó en hielo 5 min. Se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante, se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen de fenol cloroformo 1:1 por 2 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20 °C durante 1h. Posteriormente, se

centrifugó a 12000 rpm por 20 min para compactar el ADN. Se descartó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó 2 veces con etanol frío al 70% y después de secarla se suspendió en 30  $\mu$ L de agua desionizada estéril

### **1) Confirmación gen 16S en la solución de referencia por PCR punto final.**

La confirmación de presencia del Gen 16S se realizó conforme a lo planteado en el capítulo VI, tema B subtema 1 apartado a. Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* por PCR punto final (Liefting, 2009).

### **2) Estimación de la concentración del Gen 16S**

La concentración de pDNA se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop Lite®, Thermo scientific, USA) colocando 1  $\mu$ L del pDNA en el instrumento y registrando la lectura de concentración en ng/ $\mu$ L y pureza por la relación O.D 260/280, para posteriormente estimar la concentración de número de copias por cada 1  $\mu$ L de la siguiente manera: el fragmento del gen 16S resultante del PCR punto final con los oligonucleótidos OI2c/OA2 clonado y secuenciado tiene 1163 pb y este fue introducido en el plásmido PCR™2.1-TOPO, el cual tiene 3956 pb en promedio, el peso molecular de un par de bases en una doble cadena de DNA es de 660 Da, por lo que cada copia de plásmido TOPO con el gen introducido tiene una masa de  $5.610 \times 10^{-6}$  pg. La concentración de la muestra solución stock es de 97 ng/ $\mu$ L, de tal manera la concentración dada es de  $1.72 \times 10^{10}$  copias/ $\mu$ L (Wenbin y col. 2009).

### 3) Elaboración de curva de calibración estándar

La curva de calibración es preparada con la siguiente logística, primeramente a partir de la solución de referencia con concentración  $1.72 \times 10^{10}$  copias/ $\mu\text{L}$  es ajustada por dilución a una concentración  $1.0 \times 10^9$  copias/ $\mu\text{L}$ , de la cual posteriormente se realiza una dilución seriada de 1:10 hasta obtener 5 niveles de la curva, de esta manera el nivel más alto de la curva tiene una concentración teórica de  $1.0 \times 10^9$  copias/ $\mu\text{L}$  y el más bajo de  $1.0 \times 10^5$  copias/ $\mu\text{L}$ , finalmente se adiciona 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los niveles de la curva a la mezcla de reacción, lo cual se muestra esquemáticamente en el cuadro 5; la curva fue analizada por triplicado

La precisión y la robustez, se encuentran correlacionados con la eficiencia de la reacción de PCR. La eficiencia de la amplificación deberá ser determinada por la pendiente de la línea logarítmica de una curva de calibración, específicamente, Eficiencia PCR =  $10^{1/\text{pendiente}-1}$ ; el máximo teórico es de 1.0 (100%) que indica que la cantidad de producto se duplica en cada ciclo (Bustin y col. 2009; Burns y col, 2005; Medrano y col 2005). Tanto la eficiencia de la reacción, así como el coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) de la curva de calibración que indica la medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas o simplemente linealidad (Hauke y col. 2011) son los indicadores para evaluar la correcta ejecución y funcionamiento del sistema de cuantificación de CLs.



La cuantificación de las muestras problema fueron calculadas automáticamente por el software StepOne v2.1, interpolando los Cts obtenidos de las muestras a la curva de calibración.

#### **4. Análisis estadístico.**

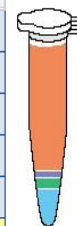
Se realizó un análisis estadístico descriptivo para la distribución espacio temporal de CLs a partir de los datos obtenidos en PCR cuantitativa, estos datos fueron exportados a partir del software StepOne v2 para el cálculo de los promedios del ciclo del umbral (Ct) y valores de desviación estándar (SD) del cuadruplicado de las 3 partes anatómicas de la planta (raíz, tallo y hoja), de cada uno de los 5 muestreos realizados. Se obtuvo la regresión lineal estándar a partir de la curva de calibración ( $y = mx + b$ ) de la concentración log del número de copias (eje-Y) contra el promedio de los valores del Ct (eje-X). La eficiencia de la amplificación de PCR (E) fue calculada a partir de la pendiente de la regresión estándar por la ecuación  $E = 10^{-\text{pendiente}} - 1$  (Wenbin y col. 2009). La estimación de concentraciones de cada una de las muestras problemas fue obtenida al interpolar los valores de Ct de cada una de las muestras a partir del modelo resultante de la regresión lineal estándar de manera automática por el software anteriormente mencionado.

Además se efectuó un análisis estadístico de asociación de las concentraciones presentes en los diferentes tiempos y órganos de plantas de tomate haciendo

uso de la regresión de Poisson, el estadístico empleado fue Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para el estudio de datos con  $\alpha=0.05$ , el procesamiento de los datos se realizó con la ayuda del programa minitab 17.

Cuadro 5. Mezcla de reactivos para la cuantificación de muestras problemas por PCR tiempo real.

Component	Volume ( $\mu$ L) for 1 Reaction	Concentración Final
Master Mix	10.00	x1
Forward Primer	0.30	75 mM
Reverse Primer	0.30	75 mM
Sample	1.00	80 nM
H <sub>2</sub> O	7.40	
Total Volume	20.00	



## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### A. ESTABLECIMIENTO DE EL MATERIAL BIOLÓGICO.

#### 1. Establecimiento y cuidado de plantas de tomate

La germinación de la variedad *Solanum lycopersicum* L V305 susceptible a *Candidatus Liberibacter solanacearum* se obtuvo después del tiempo esperado (3 días) y en las condiciones anteriormente planteadas logrando de esta manera plántulas (Figura 9), las cuales posteriormente desarrollaron un tallo uniforme y 5 hojas verdaderas al cabo de 25 días o 400 unidades calor según el URL <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/aplicaciones/ucalor.aspx>.

#### 2. Establecimiento de la colonia *B. cockerelli*.

Se observó el ciclo biológico de *Bactericera cockerelli* que comprende los huevecillos tipo ovoide y coloración amarillo-anaranjado sujetos al pedicelo, posteriormente eclosionan y dan lugar a las ninfas que comprenden 5 instares, los primeros tres instares presentaron un color amarillento, sin constricción cabeza-abdomen y ausencia de paquetes alares, y los últimos 2 instares se observó la segmentación de las patas, paquetes alares y segmentación abdominal, así como el desarrollo de la coloración verde (Ver Figura 1). Finalmente emergió el adulto de color verde amarillento y alas largas, tornándose las alas incoloras y el tórax de color café oscuro o negro después

de cuatro horas, el ciclo completo tiene una duración de 25 días, los resultados obtenidos coinciden con lo previamente descrito por otros investigadores (Marín y col. 1995), quienes postula que el ciclo de vida es dependiente de las unidades calor (UC) completando el ciclo con 335 UC, por lo que los días del ciclo son variables con respecto a la temperatura ambiental, completando el ciclo en 25 días para temperaturas promedio de 29 °C con una temperatura umbral base de 7 °C.

### **3. Establecimiento y detección por PCR de la fuente de inóculo.**

Posteriormente a la observación del ciclo de vida completo del vector *B. cockerelli* se procedió a la detección de la fuente de inóculo *Candidatus Liberibacter solanacearum* a partir de plantas de *Solanum lycopersicum* L variedad V305 que mostraban síntomas de permanente del tomate, también se tomaron psílidos de *B. cockerelli* del estadio adulto solamente por duplicado, de ambos se obtuvo un fragmento predicho de 1168 pares de bases por PCR punto final (Figura 10), además las plantas empleadas para el bioensayo se confirmaron con la ausencia del patógeno previamente a ser utilizadas en los experimentos de transmisión.



Figura 9. Establecimiento de *Solanum lycopersicum* L A). Germinación de planta de tomate. B). Plantas de tomate en fase I. C). Área de establecimiento de *Bactericera cockerelli* en invernadero, D). Estadios ninfales de *Bactericera cockerelli* sobre tallo y hoja de una planta de tomate.

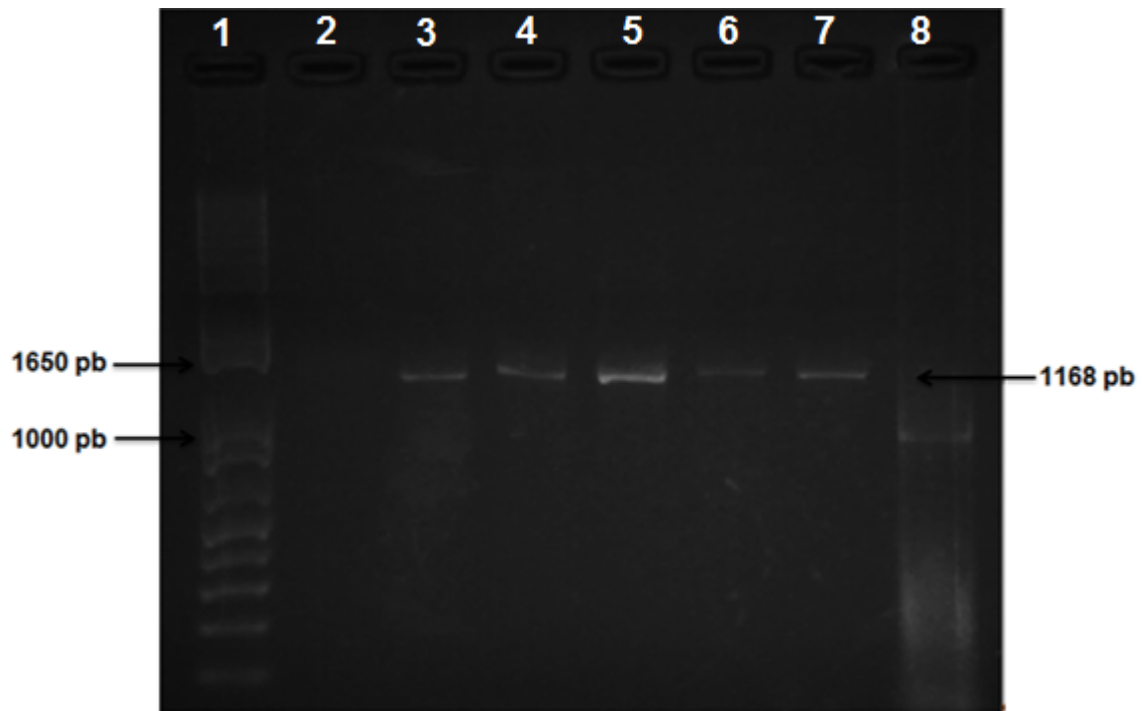


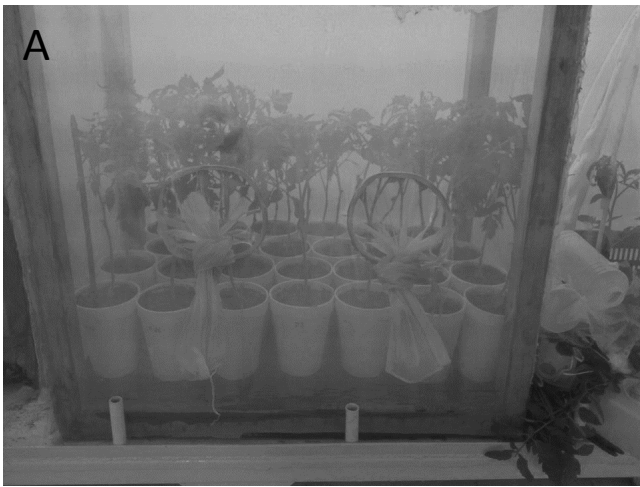
Figura 10. Separación electroforética de amplicones de CLs en gel de agarosa. Los carriles están enumerados de izquierda a derecha. 1= Marcador de peso molecular, 2= Control negativo 3=Control positivo 4 y 5= *Bactericera cockerelli* de estadio adulto, 6 y 7=Planta con permanente de tomate 8=Planta de tomate para bioensayo.

## **B. BIOENSAYO DE TRANSMISIÓN DE CLs A PLANTAS DE TOMATE.**

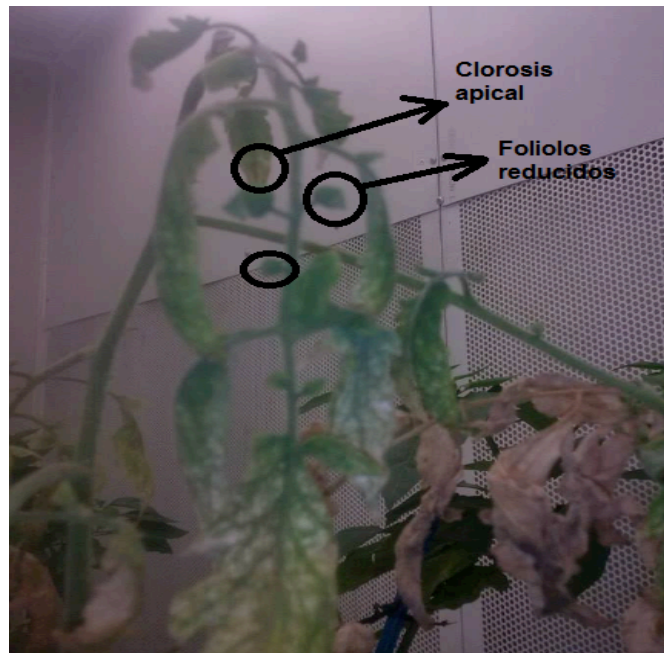
### **1. Presencia de síntomas del permanente de tomate**

Los muestreos fueron realizados conforme a lo planteado en la metodología, adquiriendo evidencia fotográfica en cada uno de los 5 muestreos realizados como se puede observar en la Figura 13, presentándose un daño físico progresivo a través del tiempo, hasta presentar claramente los síntomas típicos del permanente de tomate como aborto de la flor, folíolos reducidos, hojas enrolladas y quebradizas, clorosis apical, oscurecimiento en la base del tallo y raíz después de 56 días (Figura 12) (Garzón y col, 2009). Cabe mencionar que el tiempo de manifestación de los síntomas en condiciones de invernadero es variable y esto es mencionado por diferentes autores (Chaidez, 2014; Munyanesa y col. 2012) con 18 días en plantas de tomate de la variedad Pony Express® y 30 días para plantas de papa, respectivamente. Por otro lado se observó que los controles negativos no presentaban ninguna de las características arriba mencionadas, por consiguiente predecimos que no existe infección por CLs, sin embargo se realizó confirmación por PCR punto final afirmando lo predicho en la Figura 14.



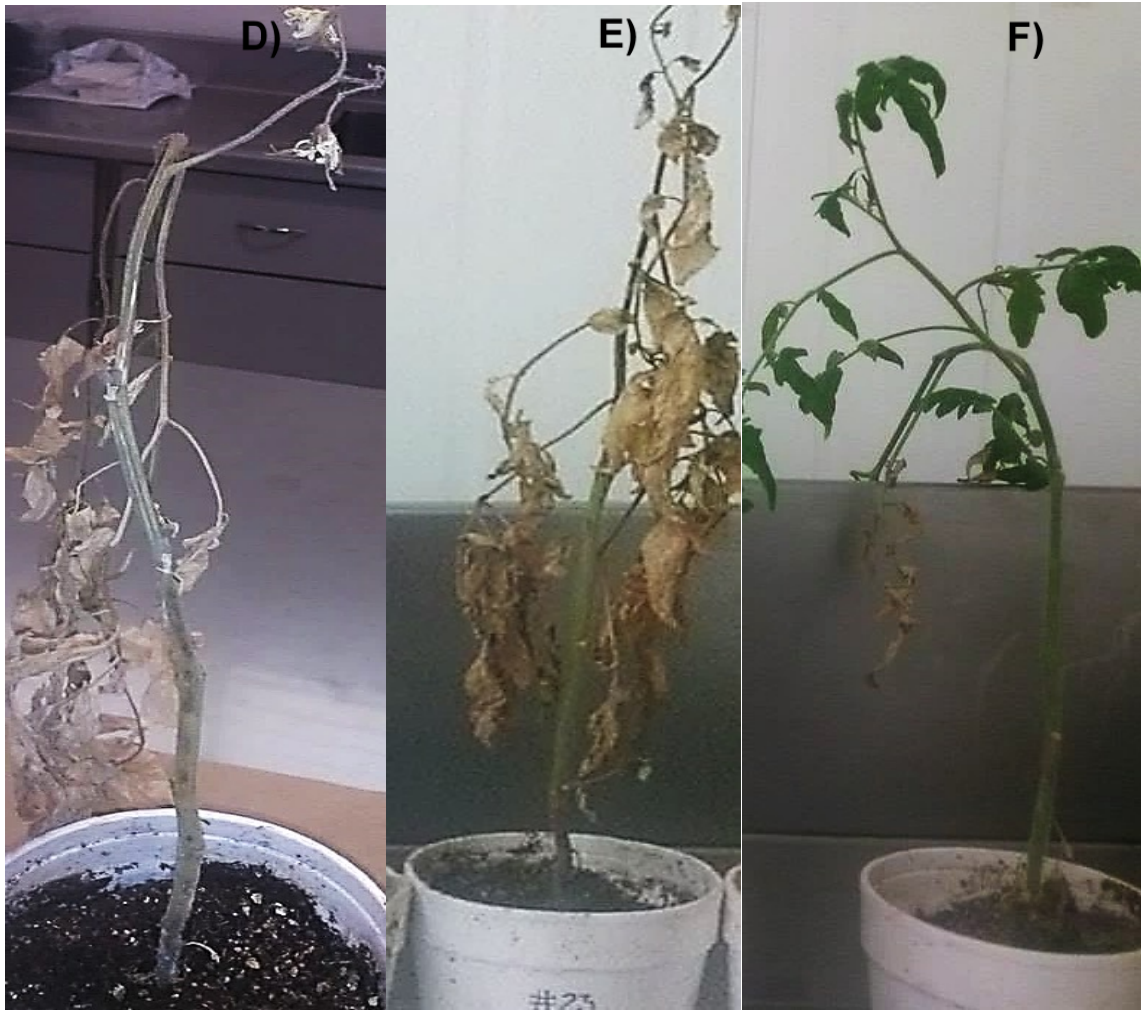


**Figura. 11.** Procedimientos de inoculación de CLs. A). Jaula entomológica con 30 plantas de *Solanum lycopersicum*, B). Inoculación directa por *Bactericera cockerelli*.



**Figura. 12.** Planta de tomate manifestando síntomas del permanente del tomate a los 56 días de inoculación.





**Figura 13.** Apariencia de plantas de *Solanum lycopersicum* L después de diferentes tiempos de inoculación con *Candidatus Liberibacter solanacearum*. A. 14 días B. 28 días C. 42 días D. 56 días E. 62 días de inoculación F. Control Negativo (Plantas sin inocular) a los 62 días.

### **C. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR PUNTO FINAL**

Los análisis de presencia/ausencia por PCR punto final de los 5 muestreos realizados se pueden observar en la Figura 14. Los amplicones de la reacción se encuentran sobre el mismo nivel del marcador de peso molecular, que corresponde al tamaño esperado de 1160 pb. En todas las imágenes C- y C+ corresponden al control negativo y control positivo de la reacción, mientras que las muestras problema se encuentran codificadas alfanuméricamente, donde el número corresponden a la unidad experimental y la letra R, T y H a raíz, tallo y hoja respectivamente.

Los resultados obtenidos indican la distribución cualitativa del OTB en 3 órganos principales de la planta. En el primer muestreo no se registró la presencia de CLs, aunque este ya había sido inoculado; esto tiene una relación directa con la detección del método PCR punto final (Teixeira y col. 2008), ya que se ha demostrado que existen inhibidores de la reacción intrínsecos en muestras problema como heparina, IgG y lípidos, solo por mencionar algunos (Al-Soud y col, 2000; Izraeli y col, 1991) que afectan la eficiencia de la reacción y aumenta la probabilidad de inhibición si el tamaño del amplicón tiene un tamaño superior a 1000 pb (Bustin, 2000), de tal manera que este método es limitante para la detección temprana del patógeno. En el segundo muestreo se logró detectar la presencia de CLs solamente en tallo, donde se observó constantemente durante el resto del bioensayo, evidenciando de esta manera



que CLs es un organismo obligado colonizador del floema (Lafleche, 1970). Por otra parte, en el muestreo 3 se obtuvo una presencia sistémica del patógeno, por lo tanto, podemos mencionar que la infección toma su punto crítico después de 42 días de la infección por CLs, coincidiendo en el rango de tiempo reportados por otros autores (30 días) con las mismas condiciones del presente trabajo, pero en especímenes de papa (Munyaneza y col. 2012). Finalmente, en el cuarto y quinto muestreo la planta mostró daño fisiológico extremo como la ausencia de flores, folíolos, y pérdida de rigidez en el tallo (Figura 13) y se observó amplificación solamente en hoja y tallo para el cuarto muestreo y en tallo solamente para el quinto muestreo. La incidencia de CLs mediante PCR punto final (Figura 15) se encontró en su mayoría en tallo (80%) donde solamente no se detectó en el primer muestreo (14 días), mientras que la menor presencia se dio en la raíz con 20%, en tanto las muestras de hoja presentaron una incidencia de 28%.

Aunque se ha demostrado que CLs es un organismo tipo bacteria obligado colonizador de floema, se ha reportado que es una bacteria que se distribuye ubicuamente a través de la planta, al igual que otras alfa protobacterias como *Candidatus Liberibacter americanus*, *africanus* y *asiaticus* (Wang, 2010), en otras palabras la bacteria coloniza todos los órganos de la planta, por lo que una vez inoculada, se esperaría detectarla por PCR punto final en cualquier órgano, pero como se pudo observar en la Figura 14 el factor tiempo es determinante para poder tener una detección oportuna del OTB por

PCR punto final, por lo que podría no detectarse en brotes nuevos de hojas apicales aunque se desarrollen los síntomas de la enfermedad en la planta, como ha sido observado previamente en árboles de naranja dulce con síntomas de la enfermedad huanglongbing o HLB, donde se reportaron resultados negativos por PCR convencional en plantas sintomáticas (falso negativo), dificultando así la homogeneidad en las técnicas de muestreo para la detección de este tipo de patógenos (Teixeira y col. 2008)

#### **D. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE CLs POR PCR TIEMPO REAL.**

##### **1. Diseño de oligonucleótidos.**

De las posibles opciones adquiridas en Primer-BLAST y Oligoanalyzer 3.1 se decidió tomar las siguientes secuencias de oligonucleótidos, para el oligo directo 5'-AAGTCCCGGCTAACTTCGTG-3' y 5'-CCTCAGCGTCAGTATCAGGC-3' para el reverso, siguiendo las recomendaciones sugeridas por diversos autores (Jian Ye y col. 2012; Basu y col. 2015;).

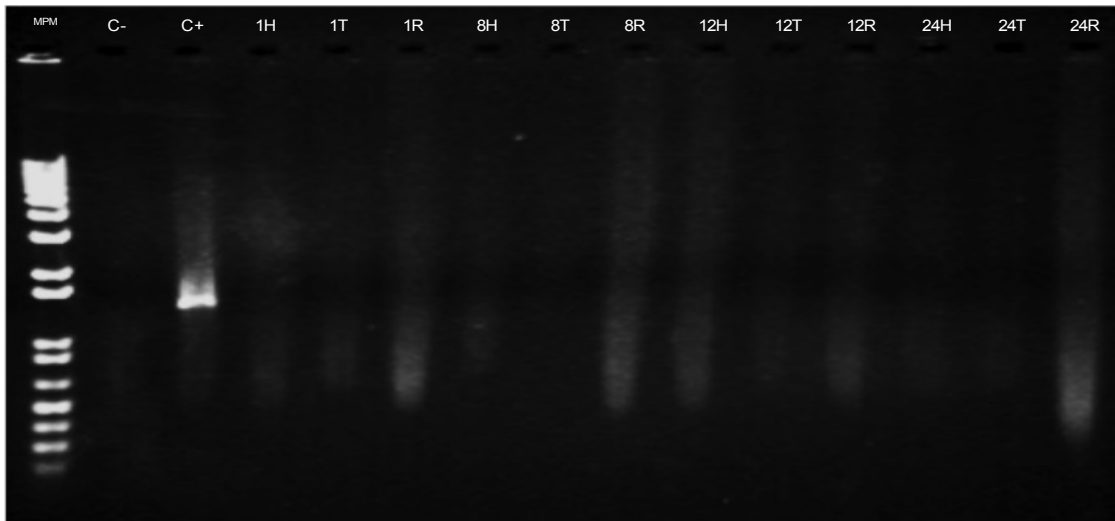
##### **2. Evaluación de oligonucleótidos**

###### **a. Especificidad**

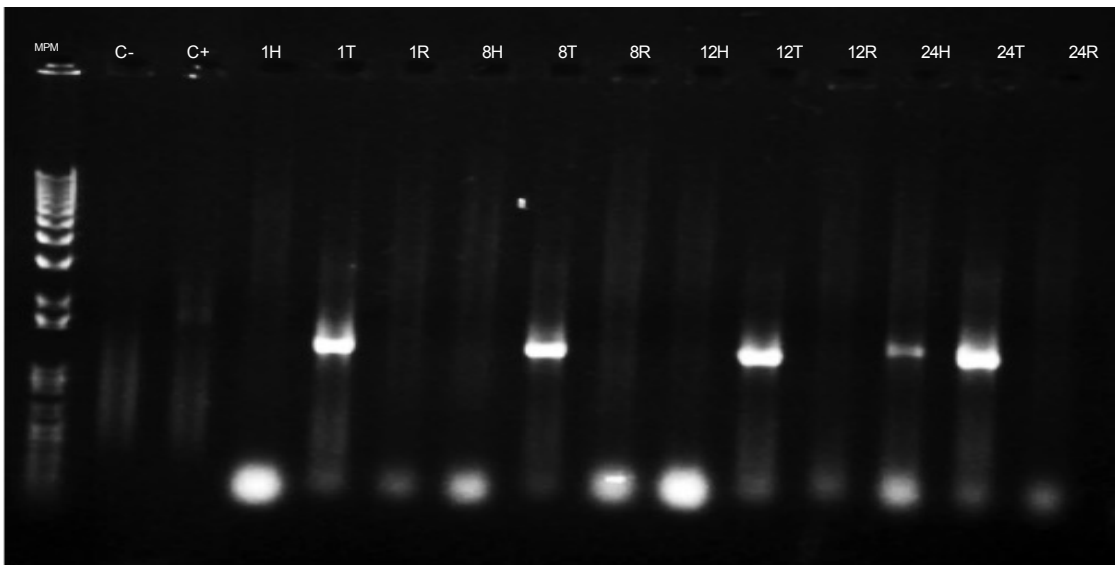
Los parámetros de evaluación del método ejecutados en el presente estudio fueron especificidad, linealidad y eficiencia, los cuales son considerados por la guía MIQE que describe la información mínima necesaria para obtener

resultados confiables de experimentos realizados por tecnología qPCR (Bustin y col, 2009)

A)

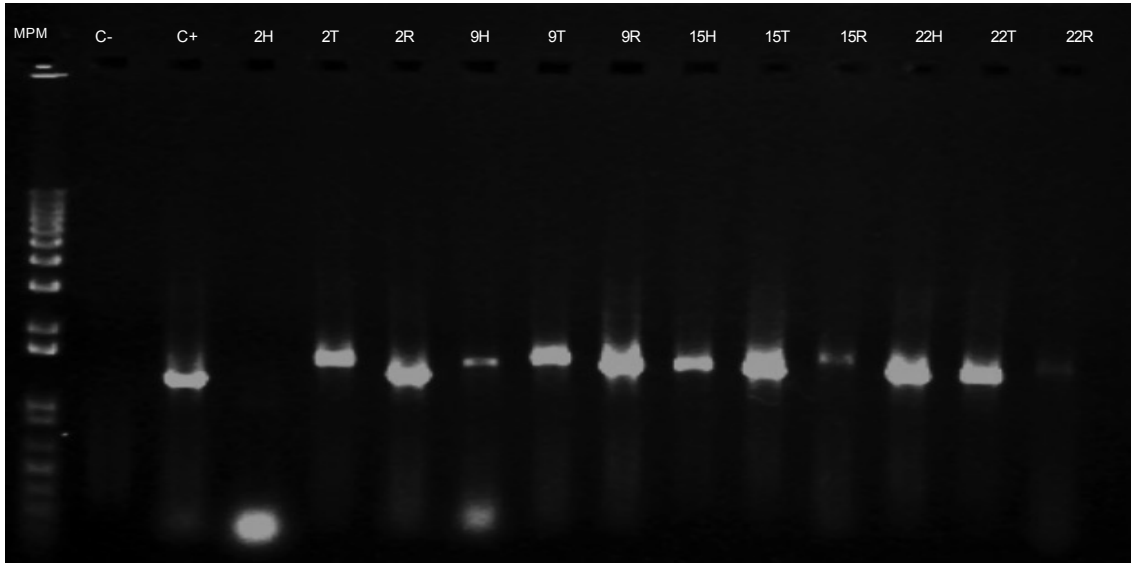


B)

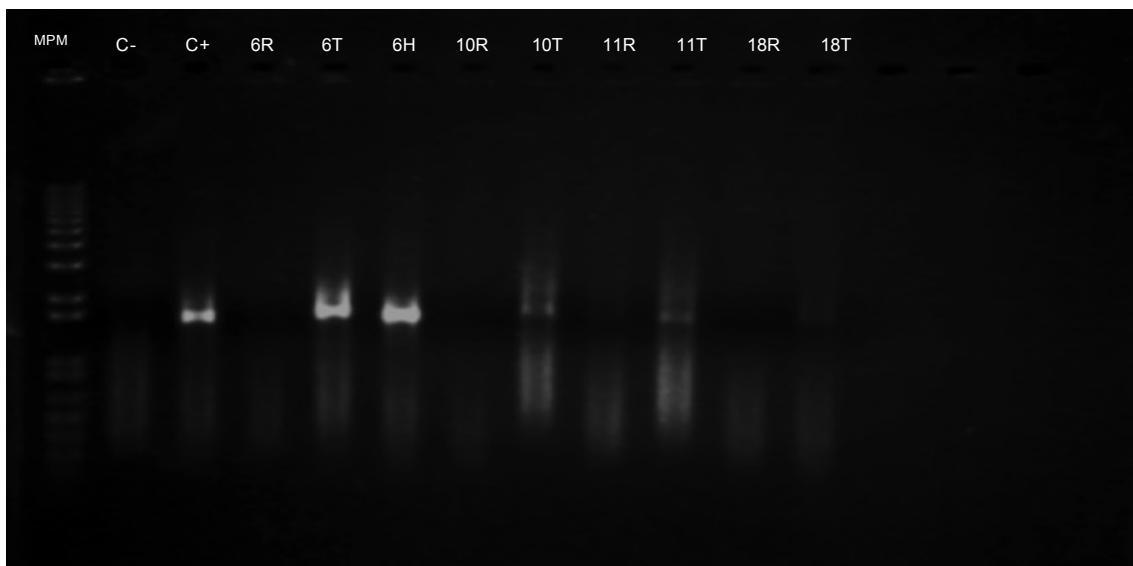




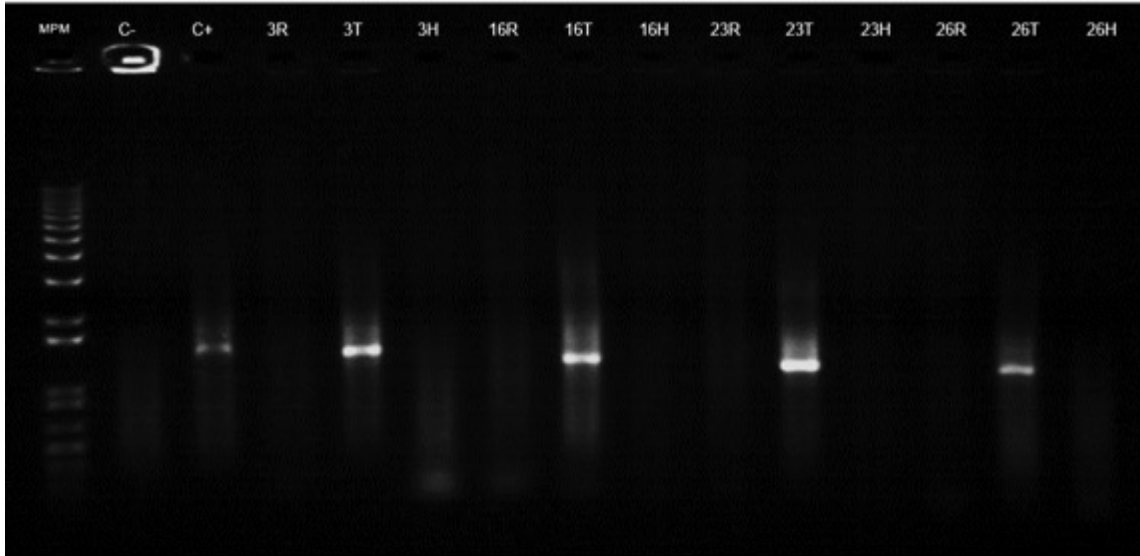
C)



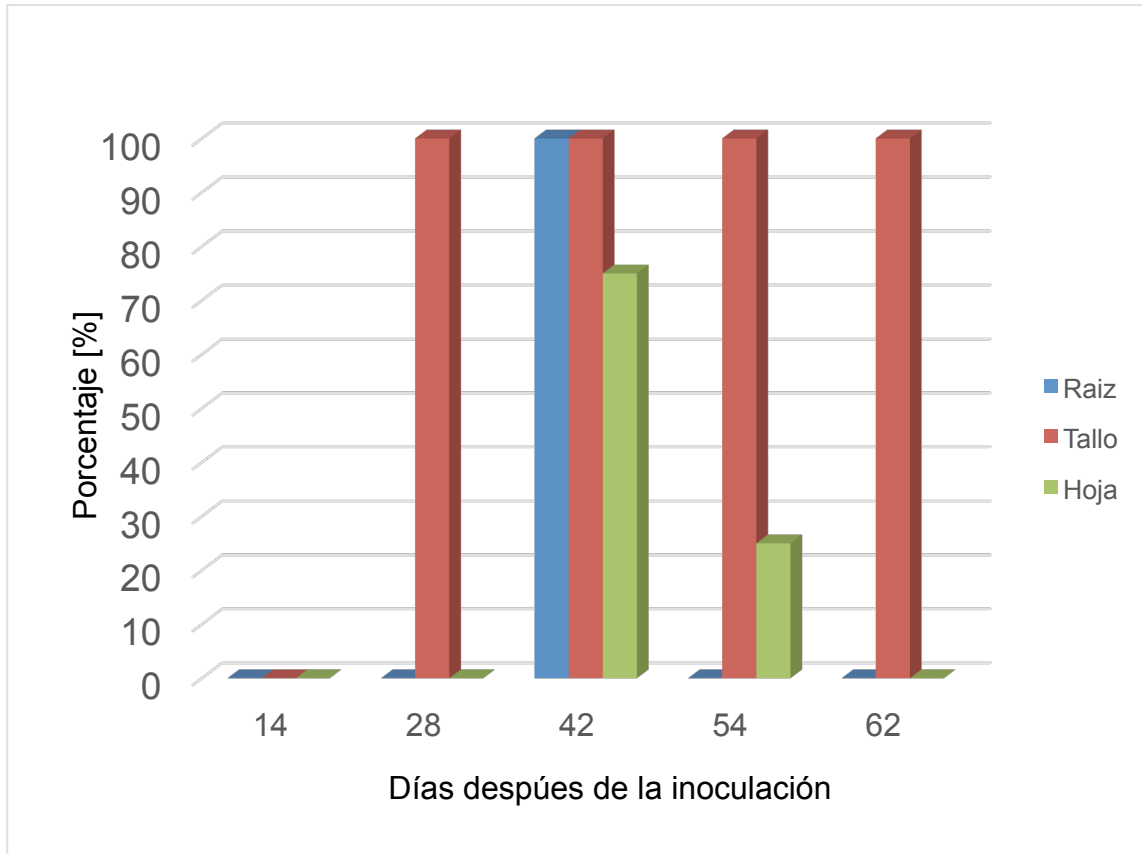
D)



E)



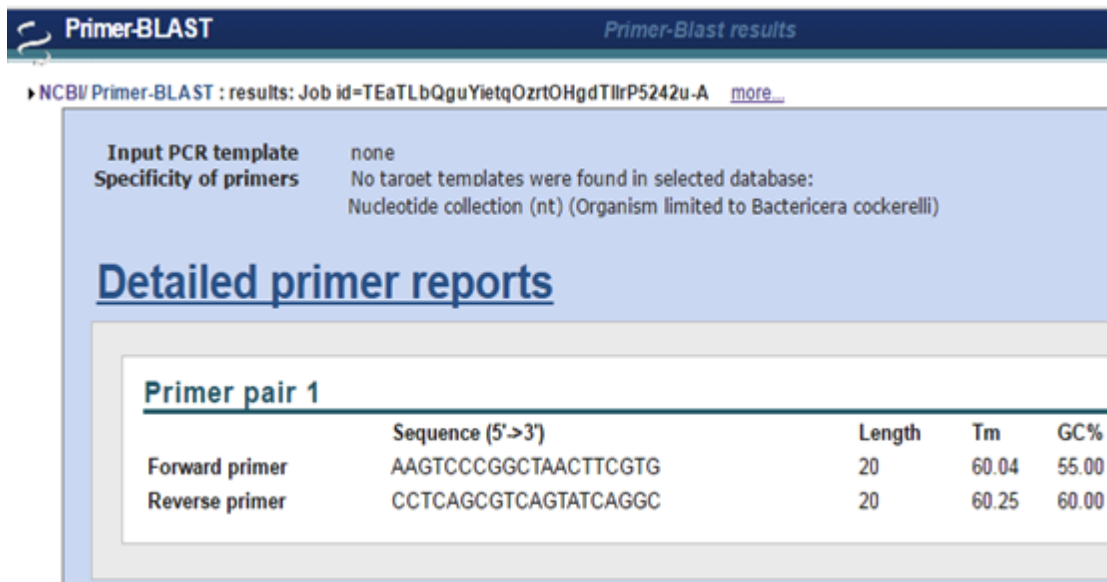
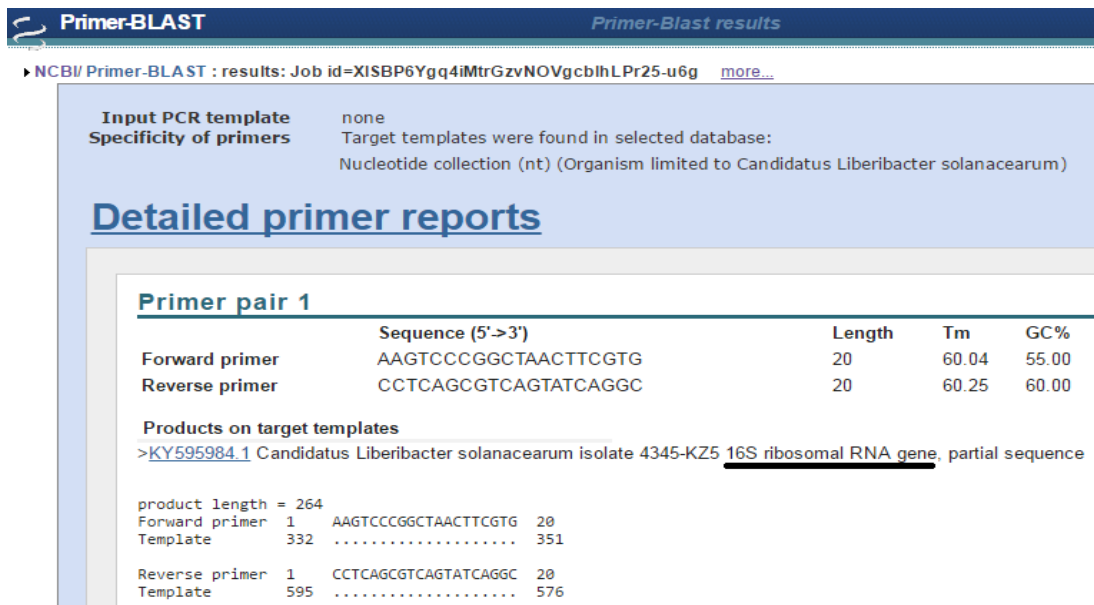
**Figura 14.** Separación electroforética en geles de agarosa de fragmentos amplificados por PCR del gen 16S de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. El orden de las imágenes corresponde a los 5 muestreos realizados A. Primer muestreo 14 días, B) Segundo muestreo 28 días, C) Tercer muestreo 42 días, D) Cuarto muestreo 56 días E) Quinto muestreo 63 días.



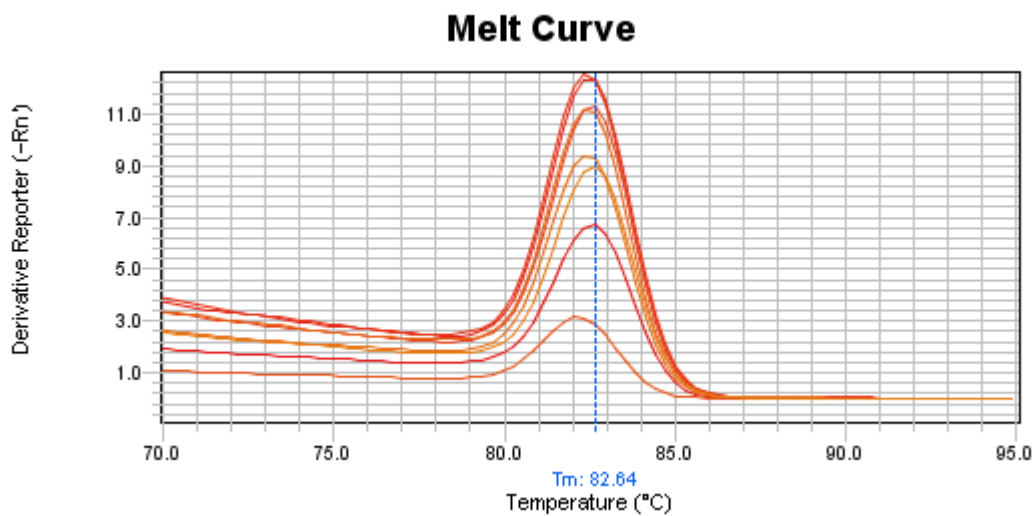
**Figura 15.** Incidencia de *Candidatus Liberibacter solanaceum* en los diferentes organos de tomate a través del tiempo. La presencia/ausencia de patógeno se determinó mediante amplificación por PCR punto final del gen 16S.

En la evaluación de la especificidad se realizaron 2 pruebas la primera de ellas fue el análisis *in silico* con la herramienta primer Blast que presentó los resultados esperados (Figura 16), donde la amplificación con respecto a la base de datos de NCBI para el genoma de *Bactericera cockerelli*, *Solanum lycopersicum* L, *Escherichia coli* fue negativo. Por otro lado, la amplificación para el genoma de *Candidatus Liberibacter solanacearum* mostró un fragmento esperado de 256 pb que corresponde al gen 16S ribosomal.

El análisis de curvas de disociación fue el segundo parámetro de evaluación de especificidad, los oligos del presente trabajo que eventualmente serán nombradas como F-CLs-263 (5'-AAGTCCCGGCTAACTTCGTG-3') y R-CLs-263 (5'-CCTCAGCGTCAGTATCAGGC-3). En la Figura 17 se puede observar un  $T_m$  promedio de 82.64 °C; aunque la magnitud es diferente al  $T_m$  teórico, esta es fue la única que se obtuvo en el estudio, por lo que podríamos indicar que existe 1 solo amplicón, es decir no hay formación de dímeros entre los oligonucleótidos, lo cual indica que el método es específico para un solo amplicón que suponemos es el deseable.



**Figura 16.** Análisis *in silico* de los oligonucleótidos F-CLs-263 y R-CLs-263 en el genoma de *Bactericera cockerelli*, *Solanum lycopersicum* L, *Escherichia coli* *Candidatus* Liberibacter solanacearum con la herramienta primer Blast para evaluar especificidad.



**Figura 17.** Curva de disociación de oligonucleótidos F-CLs-263 y R-CLs-263.

### **3. Curva de calibración y cuantificación de muestras**

#### **a. Linealidad.**

El rango de cuantificación lineal es obtenido a partir de la curva estándar de los diferentes niveles de concentraciones, tomando el máximo valor de  $1 \times 10^9$  copias/  $\mu\text{L}$  y de  $1 \times 10^5$  copias/  $\mu\text{L}$  para el mínimo nivel cuantificable, esto indica que el límite de cuantificación del presente método es de 100 000 copias/ $\mu\text{L}$ , aunque esta cantidad es muy elevada con respecto a lo reportado por otros autores con 10 copias/ $\mu\text{L}$  (Wenbin y col. 2009), el límite de cuantificación del presente trabajo fue adecuado para la cuantificación de las muestras problema, puesto que todas ellas se encontraban dentro del rango de Ct de la curva de calibración (Entre 18 y 32). En la Figura 18 se pueden observar los diferentes niveles de la curva de calibración con su respectivo Ct reportado en el software StepOne. Aunque se puede observar una señal en el control negativo esta es despreciable con respecto al umbral mínimo de detección, de tal manera que el software lo interpreta como indeterminado.

#### **b. Eficiencia y curva de calibración**

En la Figura 20 se puede observar la eficiencia de la reacción de qPCR para la cuantificación de CLs, así como el coeficiente de correlación de Pearson. La eficiencia fue de  $E(\%)=86$ , lo cual es bastante típico cuando se utilizan muestras biológicas (Kubista y col, 2006), además es un parámetro similar al mostrado por otros autores con 90 y 84% (Wenbing y col. 2009; Texeira y col. 2008). El coeficiente de correlación de Pearson de los Ct y

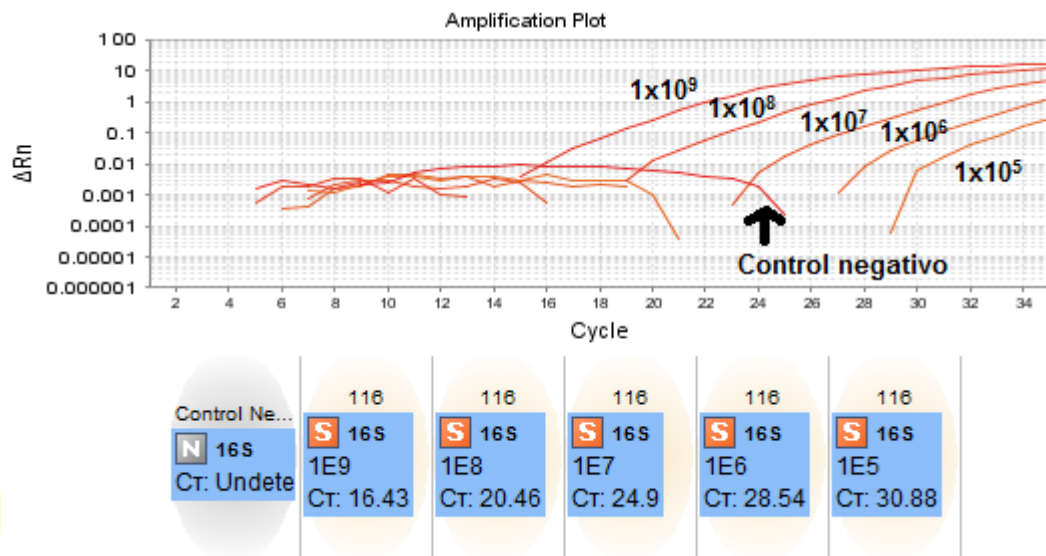


Figura 18. Diferentes niveles de la curva de calibración estándar de pDNA clona 116 y control negativo.



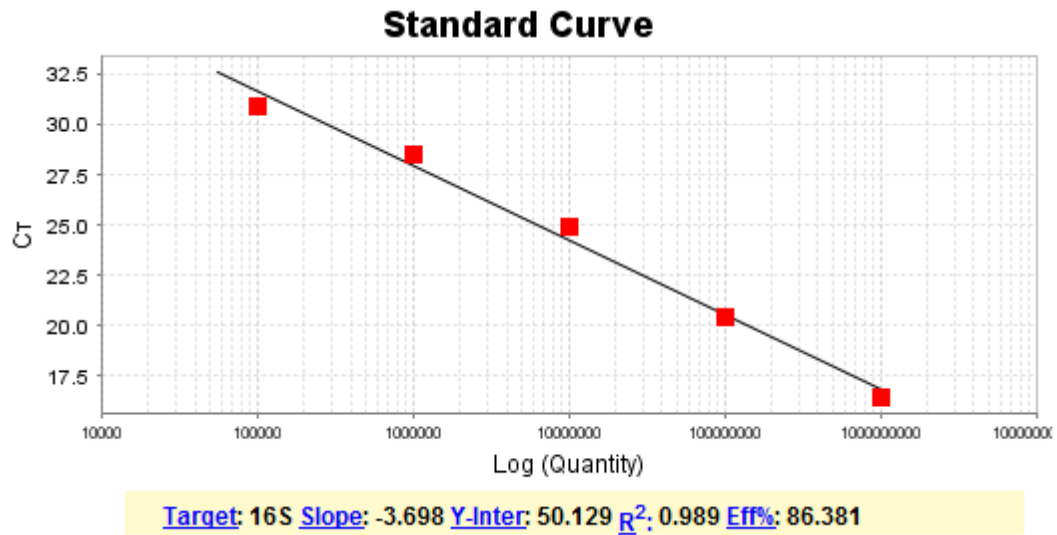


Figura 19. Eficiencia de reacción y coeficiente de correlación de Pearson de curva de calibración estándar.

concentración logarítmica de copias del genoma del patógeno por cada microlitro fue de  $R^2 = 0.989$ , los datos de pendiente ( $m=-3.698$ ) e intercepto ( $y=50.129$ ) obtenidos de la regresión fueron utilizados para interpolar los Cts de las muestras problemas y cuantificar de manera automática la concentración de CLs en el software StepOne.

#### **E. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR TIEMPO REAL**

Las muestras de DNA templado utilizadas para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* por PCR punto final también fueron sometidas al análisis cuantitativo por PCR tiempo real, los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 21 y cuadro 6, en donde la concentración del OTB a los 14 días se mantiene con una variación relativamente homogénea con  $7 \times 10^5$  copias/ $\mu$ L en promedio para las 3 partes anatómicas de la planta de tomate, mientras que a los 28 días existe una distribución no uniforme en la concentración para raíz, hoja y tallo con valores de  $1 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$  y  $9 \times 10^8$  copias/ $\mu$ L, respectivamente, en donde es evidente que el tallo contiene la mayor concentración de CLs. Después de 42 días los valores obtenidos fueron de  $2 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$  y  $4 \times 10^8$  para raíz, hoja y tallo, respectivamente; después de 52 días del ensayo no se detectó concentración alguna de CLs en raíz, mientras que en hoja y tallo se cuantificó  $1 \times 10^8$  y  $2 \times 10^8$  copias/ $\mu$ L respectivamente. A los 62 días del bioensayo este órgano contiene el título mayor con  $7 \times 10^8$  copias/ $\mu$ L. Cabe mencionar que la concentración de la bacteria siempre se mantuvo

elevada en el tallo a través del tiempo, los resultados del presente trabajo difieren de lo obtenido por Wenbin, 2008 quien reporta la mayor concentración de CLs en la raíz de plantas de papa con más de 3 órdenes de magnitud, e incluso la concentración de OTB en tallo fue significativamente más baja que en otros tejidos. La producción de frutos de ambas hortalizas es diferente, en plantas de tomate los frutos son aéreos mientras que en papa los tubérculos son subterráneos, por lo que se sugiere que este comportamiento influye en la distribución de CLs en planta.

#### **F. ANALISIS COMPARATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CLs EN PLANTAS DE TOMATE POR PCR PUNTO FINAL Y PCR TIEMPO REAL.**

Actualmente la tendencia en el uso de técnicas de PCR en tiempo real para la cuantificación de ácidos nucleicos ha aumentado debido a las bondades que esta técnica ofrece, obteniendo resultados robustos, reproducibles y un amplio dinamismo de cuantificación (más de ocho órdenes de magnitud) así como la significativamente mayor confiabilidad de los resultados comparados con la PCR convencional (Wilhelm y col. 2003; Schmittgen y col. 2000). En el presente trabajo se puede observar estas características, comenzando con la comparación de resultados del primer muestreo en donde por cPCR no se obtuvo ninguna amplificación del gen (Figura 15), mientras que en qPCR se pudo detectar un promedio de  $4 \times 10^5$  en toda la planta (Cuadro 5), comprobando

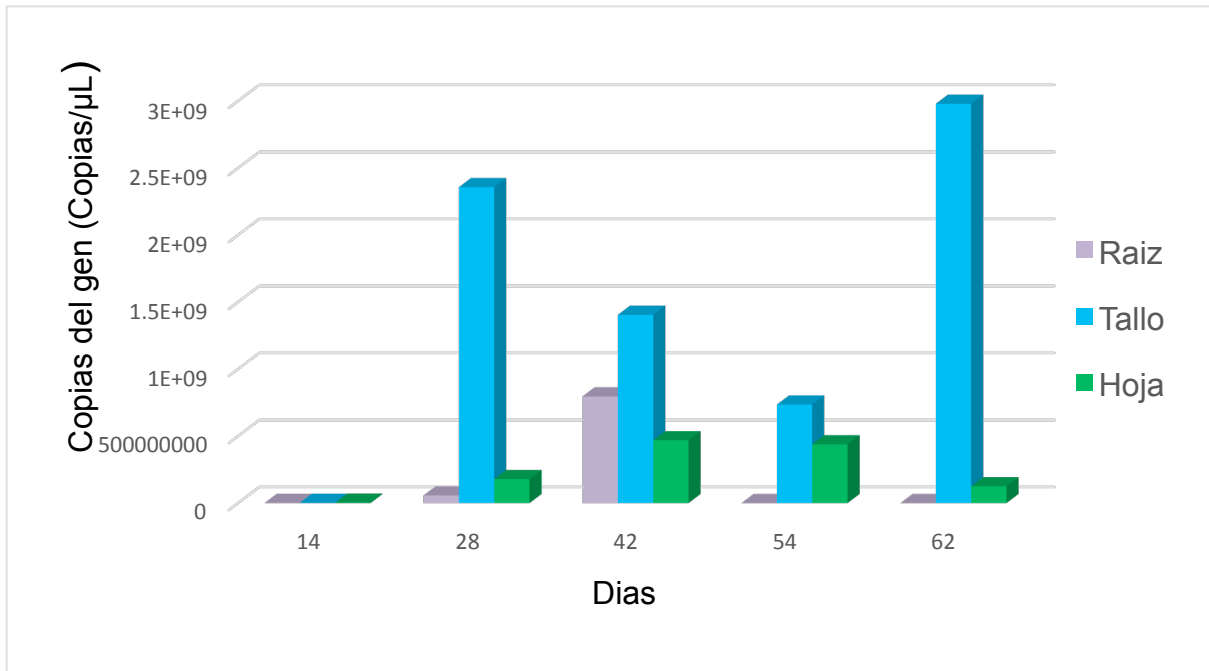


Figura 20. Concentración de CLs acumulada en los órganos de raíz, tallo y hoja de planta de tomate a través del tiempo.

**Cuadro 6.** Resultados de la concentración de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los diferentes órganos de planta de tomate a través del tiempo.

	Raíz	Tallo	Hoja
	(Copias/ $\mu$ L)		
1ero muestreo	1.E+05	1.E+06	1.E+06
	1.E+00	3.E+05	5.E+05
	9.E+04	ND	3.E+05
	1.E+05	2.E+05	1.E+06
2do muestro	8.E+04	5.E+08	3.E+07
	2.E+05	4.E+08	1.E+07
	3.E+07	2.E+08	7.E+07
	1.E+00	1.E+09	7.E+07
3er muestreo	7.E+08	5.E+08	1.E+08
	1.E+08	1.E+08	9.E+06
	ND <sup>1</sup>	3.E+08	2.E+07
	ND	5.E+08	3.E+08
4to muestreo	ND	5.E+08	4.E+08
	ND	9.E+07	NM <sup>2</sup>
	ND	4.E+06	NM
	ND	7.E+08	NM
5to muestreo	ND	1.E+09	5.E+06
	ND	1.E+09	5.E+07
	ND	8.E+07	6.E+07
	ND	7.E+08	9.E+06

<sup>1</sup>: No existe detección

<sup>2</sup>: No existe muestra.

así la sensibilidad que el método desarrollado ofrece. Además, en el muestreo 2 se detectó solamente en tallo por cPCR, en tanto que para qPCR de nueva cuenta se obtuvo una amplificación en todos los órganos; sin embargo, la diferencia en la concentración para este muestreo es más dispersa, mostrando una mayor concentración en el tallo, lo cual también se observó en el tercer muestreo aunque la concentración descendió ligeramente (Figura 21) al igual que la hoja, no obstante para este mismo tiempo de muestreo se registró un aumento significativo en la concentración de la raíz, en general se puede observar una distribución homogénea de CLs en este tiempo, sin embargo este comportamiento no se mantiene a partir del muestreo 4 y 5 no hay detección de CLs en raíz tanto en qPCR y cPCR, por otro lado el tallo presentó amplificación para ambos muestreos por ambas técnicas y se puede observar que la concentración se mantiene elevadas con magnitudes de  $10^8$  e incluso  $10^9$  copias/ $\mu$ L, motivo por el cual se pudo detectar por cPCR. Finalmente, durante el muestreo 5 la detección de CLs por cPCR vuelve a ser una limitante presentando ausencia del patógeno, resultando un falso negativo para el análisis, por lo tanto se puede observar que la relación del factor tiempo y órgano es crítica para la detección de CLs por la técnica de cPCR en plantas de tomate.

## **G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

### **1. Análisis de asociación espacio temporal de *Candidatus***

#### ***Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate.**

Para determinar la relación existente entre la concentración de CLs a través del tiempo en los diferentes órganos de la planta de tomate se realizó un análisis de regresión de Poisson. La interacción de los días en relación a la concentración reportada en número de copias por cada microlitro (Figura 22), muestra que hay una asociación positiva, ya que hubo un aumento de la concentración del patógeno a través del tiempo. Por otro lado, se puede observar (Figura 22) que la distribución de la concentración de CLs en los diferentes órganos no es homogénea, observándose una mayor acumulación del patógeno en el tallo con un promedio de  $7 \times 10^8$  copias/uL, mientras que en hoja se presentó una concentración relativamente más baja con un promedio de  $3 \times 10^7$  copias/uL y para el caso de raíz no existió detección significativa en la mayoría de los muestreos con respecto a la concentración media del patógeno. El valor de coeficiente de correlación de la regresión de Poisson fue de  $R^2=0.47$ , cuya ecuación de predicción es la siguiente:

$$Y' = 12.9082 + 0.0 \text{ PA\_H} - 1.33199 \text{ PA\_R} + 0.862658 \text{ PA\_T} + 0.0 \text{ PERIODO\_1} \\ + 6.45120 \text{ PERIODO\_2} + 6.12019 \text{ PERIODO\_3} + 5.75959 \text{ PERIODO\_4} \\ + 6.27128 \text{ PERIODO\_5}$$

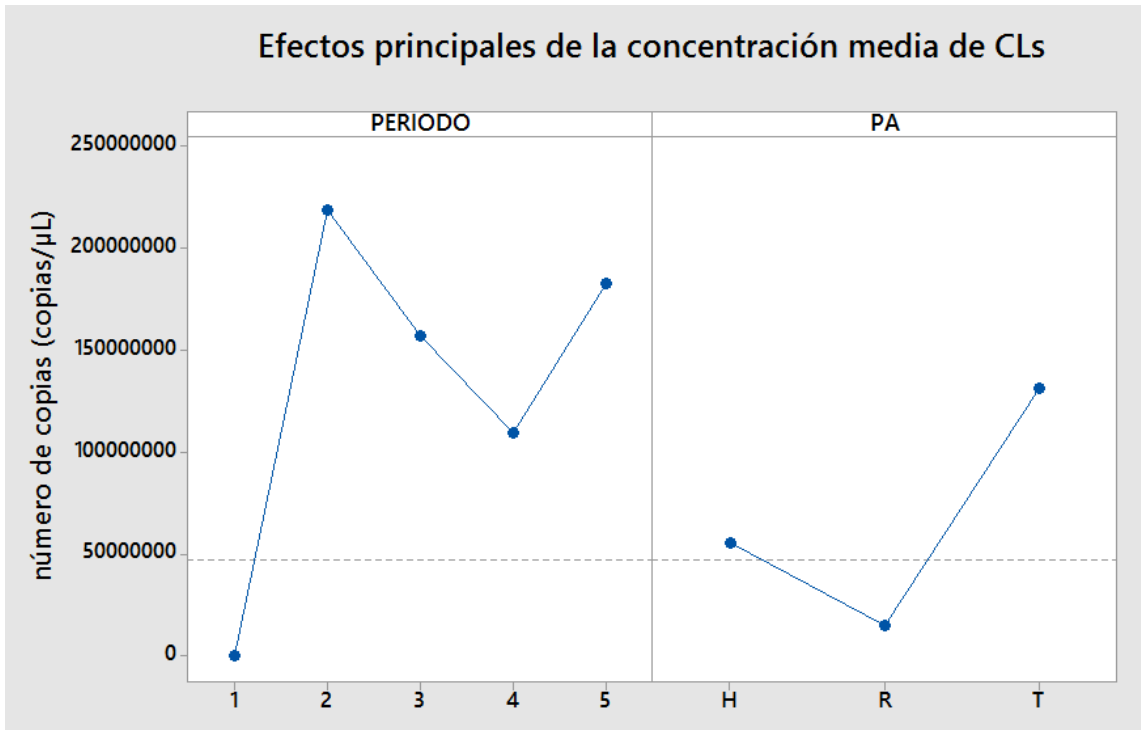


Figura 21. Gráfica de interacciones entre el tiempo y la concentración de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en diferentes órganos de plantas de tomate.



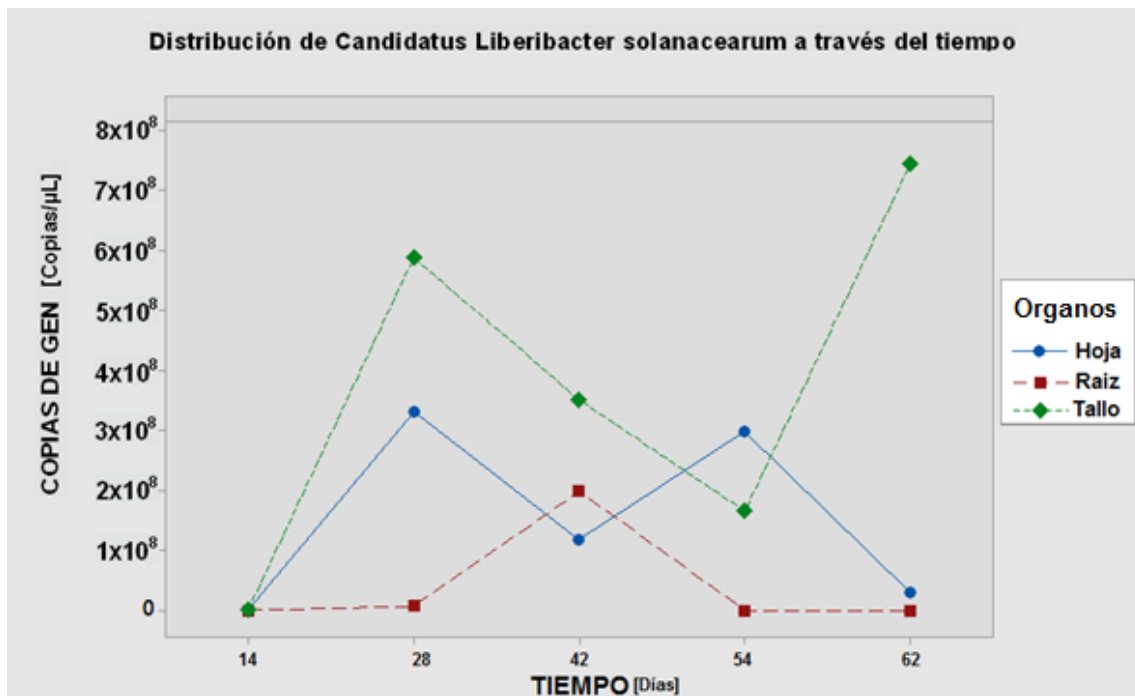


Figura 22. Gráfica la concentración promedio de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en diferentes órganos de plantas de tomate.

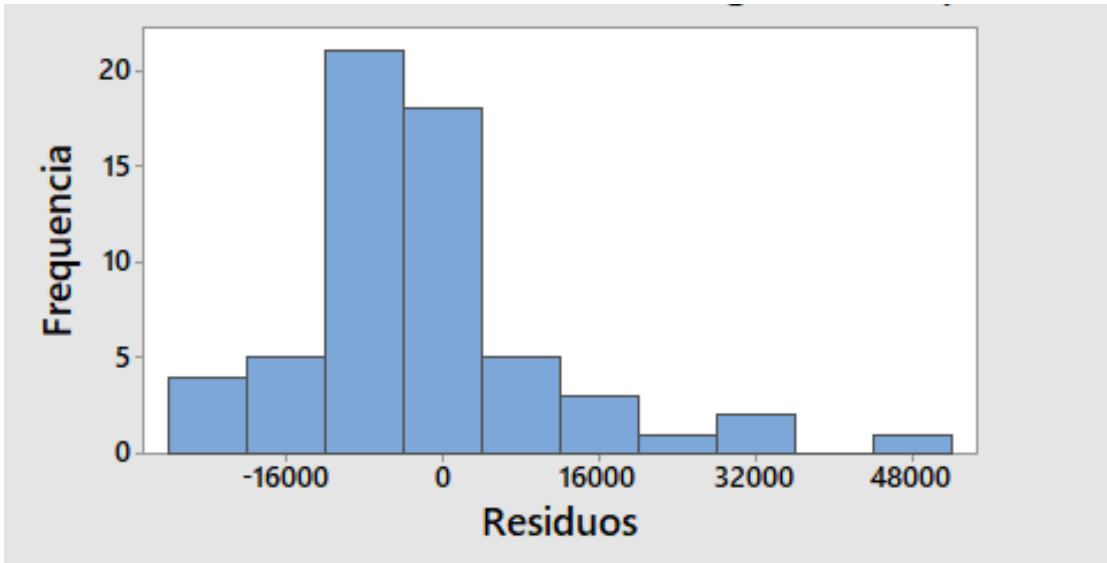


Figura 23. Gráfica de residuos del analisis de regresión de poisson.

Aunque los valores de asociación no fueron altos, el modelo funcionó para hacer el análisis de medias ajustadas, tomando en consideración una significancia de  $(\alpha) = 0.05$ ; por otro lado el valor de  $R^2$  es causado por la dispersión de los datos obtenidos (residuos) como se puede observar en la figura 24, lo cual se debe a que existe ausencia del patógeno con valores cero principalmente de raíz.

## **2. Análisis de varianza espacio temporal de las concentraciones de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate.**

El ANOVA de las concentraciones de CLs se muestra en el cuadro 7, en donde se puede observar una diferencia significativa entre las concentraciones de CLs en los diferentes órganos ( $P < 0.000$ ) y periodos ( $P < 0.000$ ) de las muestras de la planta de tomate. La significancia en los datos indica que la concentración de la bacteria no se encuentra homogéneamente en la planta en los periodos y órganos analizados, lo cual ha sido consignado por otros investigadores como se menciona a continuación. Wenbin y col (2009) reportaron la dinámica de población de bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de papa y encontraron que la concentración de bacteria es significativamente menor en el tallo de plantas, encontrándose la mayor concentración en raíz con  $3 \times 10^8$  genomas por cada gramo de tejido fresco, mientras que el promedio de población bacteriana en los tejidos fue de  $1-5 \times 10^5$  equivalentes de genoma por cada gramo de tejido. Así mismo Wenbin y col (2008) demostraron la presencia ubicua de la bacteria no cultivable

**Cuadro 7.** ANOVA de la distribución espacio temporal de CLs en los diferentes órganos de la planta de tomate.

Fuente	G.L.	Desviación ajustada	Media ajustada	Chi- Square ( $\chi^2$ )	P- value
Regresión	6	11876715361	1979452560	1.18767E+10	0.000
Órganos	2	6228120780	3114060390	6.22812E+09	0.000
Periodo	4	5648594581	1412148645	5.64859E+09	0.000
Error	53	13368339064	252232813		
Total	59	25245054424			

*Candidatus Liberibacter asiaticus* en arboles de cítricos; en todos los puntos de muestreo de nervadura principal de la hoja, limbo de la hoja, corteza del tallo y raíz detectaron al patógeno, encontrándose la mayor concentración en la nervadura principal, Sin embargo no se encontró diferencia significativa entre las poblaciones de la bacteria en los diferentes tejidos, la concentración promedio de CLa fue de  $10 \times 10^{10}$  genomas por gramo de tejido fresco.

## VIII. CONCLUSIONES

El método estandarizado de PCR tiempo real fue adecuado para la identificación y cuantificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

La distribución de la bacteria no fue uniforme en tejidos de diferentes órganos en plantas de tomate. La mayor concentración se encontró en el tallo, en comparación con la raíz y la hoja.

La amplificación de CLs por la técnica de PCR punto final pudo ser detectada a partir de 28 días de inoculación en tallo solamente, mientras que en PCR tiempo real la detección se logró desde los 14 días posterior a la inoculación en raíz, tallo y hoja.

Los resultados del presente estudio sugieren que el muestreo debe realizarse en el tallo de la planta de tomate que es donde se encuentra la mayor concentración de CLs. La metodología propuesta permitiría aumentar la precisión del diagnóstico de esta bacteria y contribuir en el diseño de una estrategia de detección temprana como parte de un manejo integral de calidad de hortalizas afectadas con dicho patógeno.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, E., V.G. Segonda, B. Bextine, K.F. McCue, J.E. Munyanesa. 2013. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" on tobacco in Honduras. *Plant Dis.* 97: 1379.
- Alfaro, A., M.C. Cebrián, F.J. Villaescusa, A. Hermoso, J.C. Ferrándiz, S. Sanjuán, y M.I. Font. 2012. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Carrot in Mainland Spain. *Plant Dis.* 96:582
- Al-Soud, W.A., L.J. Jonsson y J. Radström. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 38: 345-50.
- Batool, A., Y. Iftikhar, S.M Mughal, M.M. Khan, M.J. Jaskani, M. Abbas e I.A. Khan. 2007. Citrus greening disease – A mayor cause of citrus decline in the world – A review. *Hortic Sci.* 34:159-66.
- Basu, C. y B. Thorntony. 2001. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ.* 39: 145–154.
- Birnboim, H.C. y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J Plant Pathol.* 88: 7-37.
- Buchman, J.L, G.S Venkatesan y J.E. Munyaneza. 2011. Vector Transmission Efficiency of *Liberibacter* by *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in Zebra Chip Potato Disease: Effects of Psyllid Life Stage and Inoculation Access Period. *J Econ Entomol.* 104: 1486-1495.
- Buckner, J.S. 2002. Characterization and functions of the whitefly egg pedicel. *Arch Insect Biochem Physiol.* 49:22-33.
- Burckhardt, D. y P. Lauterer. 1997. A taxonomic reassessment of the trioziid genus *Bactericera* (Hemiptera: Psylloidea). *J Nat Hist.* 31:99-153

- Burns, M.J., G.J. Nixon, C.A Foy y N. Harris. 2005. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 5:31-44.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.*, 25: 169-93.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista y J. Vandesompele. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-22.
- Chaidez, R. 2014. Determinación de transmisión transovárica de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Christensen, N.M., M. Nicolaisen, M. Hansen y A. Schulz. 2004. Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Ame Phy Soc.* 17: 1175-84.
- Cranshaw, W.S. 1994. The potato/tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc), as a pest of potato. *Aps Symp Ser.* 83-95.
- Crosslin, J.M., H. Lin. and J.E. Munyaneza. 2011. Detection of '*Candidatus Liberibacter Solanacearum*' in the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc), by Conventional and Real-Time PCR. *Southwest Entomol.* 36: 125-35.
- Doyle, J.J. and J.A Doyle. 1990. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus Research.* 12:13-15.
- Flores, O.A., M.G. Gallegos y García M.O. 2004. Reportado en: Memorias del simposio punta morada de la papa en Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. Saltillo, Coahuila, México.



- García, C.B. 2007. Transmisión de fitoplasma por *Bactericera cockerelli* (Sulc) a plantas de chile, papa y tomate. Tesis maestría IPN, Guasave, Sinaloa, México.
- Garnier, M., N. Danel y Bové M. 1984. The greening organism is a gram negative bacterium. En Proceedings of 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologist. Riverside, University of California. pp 115-124
- Garzón, J.A. 1984. Enfermedad del "Permanente" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Celaya, Guanajuato. San Luís Potosi. Resúmenes, Sociedad Mexicana Fitopatología.
- Garzón, J.A. 2002. El "pulgon saltador" o la paratrioza, una amenaza para la horticultura de Sinaloa. Memoria del Taller sobre Paratrioza *cockerelli* Sulc, como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas., (págs. 9-12). Campo experimental de Culiacán-INIFAP.
- Garzón, J.A., S. Velarde, A. Marín y O.G. Cárdenas. 2005. "Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al 'permanente del tomate' por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc en México. Entomología Mexicana. 4:672-74
- Garzón, J.A., O.G. Cárdenas, R. Bujanos, A. Marín, A. Becerra, S. Velarde, C. Reyes, M. González y J.L. Martínez. 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad 'Permanente del tomate' en México. Agricultura Técnica en México. 35:58-69.
- Garzón, J.A. 2010. *Paratrioza (Bactericera) cockerelli* Sulc, Vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*-Zebra chip en papa.
- Gudmestad, N.C. y G.A. Secor. 2007. Zebra Chips: A new disease of potato. Nebr. Potato eyes. 19:1-4.
- Hansen, A.K., J.T. Trumble, R. Southamer and T.D Paine. 2008. A new huanglongbing species, "*Candidatus Liberibacter psyllaourous*" found

- infected tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (sulc). Appl Environ Microbiol. 74: 5862-65
- Hauke, J., and T. Kossowski. 2011. Comparison of Values of Pearson's and Spearman's Correlation Coefficients on the Same Sets of Data. Quaestiones Geographicae. 30:87-93
- Hernández, V.A., G.A. Sánchez, T. Frías y E. Padrón. 2006. Factores abióticos y su relación con el síndrome de la punta morada de la papa. Memoria XXII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa. ALAP, Toluca, México. C-17.
- Hong, L., L. Binghai, J.M. Glynn, H. Doddapaneni, E.L. Civerolo, C. Chen, Y. Duan, L. Zhou y C.M. Vahling. 2011. The Complete Genome Sequence of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum', the Bacterium Associated with Potato Zebra Chip Disease. Plos One. 6:2-13.
- Hung, T.H., Hung S.C., Chen C.N., Hsu M.H. and J. Su. 2004. Detection by PCR of *Candidatus* Liberibacter asiaticum, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllidas: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathol. 53:96-102
- Integrated DNA Technologies. (2016). IDT. Recuperado el 27 de Enero de 2017, <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Izraeli, S., C. Pfeleiderer, and T. Lion. 1991. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. Nucleic Acids Res. 19: 6051.
- Jagoueix S., J.M. Bové and M. Garnier. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. Int J Syst Bacteriol. 44:379-86.
- Jagoueix, S., J.M Bové and M. Garnier. 1996. PCR detection of the two '*Candidatus*' Liberibacter species associated with greening disease of citrus. Mol Cell Probes. 10:43-50

- Janes, M.J. 1936. *Paratrioza cockerelli* Sulc on tomatoes in southwest Texas. J Econ Entomol. 30:379.
- Knowlton G.F., and M.J. Janes. 1931. Studies of the biology for *Paratrioza cockerelli*. Ann Entomol Soc Am. 24:283-91
- Kubista, M., J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind y A. Ståhlberg. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol Asp Med. 27: 95-125.
- Lafleche, D. y J.M. Bové. 1970. Mycoplasma type structure in orange leaves with greening disease. Comptes rendus des seances de l'académie des sciences. 270:1915-17
- Lee, I.M., K.D Bottner, J.E. Munyaneza, G.A Secorand y N.C. Gudmestad. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. Plant Dis. 429.
- Lee, I.M., K.D. Bottner, G. Secor y V. Rivera. 2006. "*Candidatus* phytoplasma americanum" a phytoplasma associated with potato purple top disease complex. Int J Syst Evol Micr. 56:1593-7.
- Lepka, P., M. Stitt, E. Moll, y E. Seemüller. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. Physiol Mol Plant Physiol. 55:59-68.
- Leyva, N.E., J.B. Ochoa, D.S. Leal y J.P Martinez. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato disease in Mexico. Can J Microbiol. 48:1062-1068.
- Liefting, L.W., Z.C. Perez, G.R.G. Clover y J.A.D. Anderson. 2009. A New '*Candidatus* Liberibacter' Species in *Solanum tuberosum* in New Zeland. Plant Dis. 92:208-214.
- Liefting, L.W., B.S. Weir, S.R. Pennycook y G.R.G Clover. 2009. *Candidatus* Liberibacter solanacearum', associated with plants in the family Solanaceae. J Syst Evol Microbio. 59: 2274-6

- List, M.G. 1939. The Effect of Temperature Upon Egg Deposition, Egg Hatch and Nymphal Development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). J Econ Entomol. 32: 30-36
- Marín, A., J.A Garzón, A. Becerra, C. Mejía, R. Bujanos y F.K. Byerly. 1995. Ciclo Biológico y morfología del salerillo *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: psyllidae) Vector de la enfermedad "Permanente del jitomate" en el Bajío. Manejo Integral de Plagas. 25-32.
- Medrano, J.F. y M.L. Wong. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biology Techniques. 39: 75-85
- Melgoza, C. 2016. Análisis filogeográfico de *Candidatus Liberibacter solanacearum* aislada de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) papa (*Solanum tuberosum* L) y Chile (*Capsicum annum*) en México. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Mendoza, MD. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 22: 238-45.
- Munyanza, J.E., J.M Crosslin y J.E.Upton. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "Zebra Chip," a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. J Econ Entomol. 656-63.
- Munyanza, J.E., T.W. Fisher, V.G. Sengoda, S.F. Garczynski, A. Nissinen y A. Lemmetty. 2010. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in carrots in Europe. Plants Dis. 94:639.
- Munyanza, J.E., A. Lemmetty, A.L. Nissinen, V.G. Sengoda y T.W. Fisher. 2011. Molecular detection of aster yellow phytoplasma and *Candidatus Liberibacter solanacearum* in carrots affected by the psyllid *Triozza apicalis* (Homoptera: Triozidae) in Finland. J Plant Path. 93:697-700
- Munyanza, J.E., V.G. Sengoda, J.L. Buchman y T.W. Fisher. 2012. Effects of temperature on "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" and zebra chip potato disease symptom development. Plant Dis. 96:18-23

- Murphy, A.F., S.I. Rondon y A.S. Jensen. 2013. First Report of Potato Psyllids, *Bactericera cockerelli*, Overwintering in the Pacific Northwest. Am J Potato Res. 90:294-296.
- Nachappa, P., J. Levy, E. Pierson. y C. Tamborindeguy. 2001. Diversity of endosymbiots in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera:Triozidae), Vector of the zebra chip Disease of potato. Curr Microbiol. 62:1510-20
- NCBI. 2016. National Center for Biotechnology information. Recuperado en Octubre de 2016, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- PaDIL. (2015). Padil. Recuperado el 2015, de <http://www.padil.gov.au/>
- Rashed, A., T.D. Nash, L. Paetzold, F. Workneh y C.M. Rush. 2012. Transmission efficiency of "Candidatus Liberibacter solanacearum" and potato zebra chips disease progress in relation to pathogen titer, vector numbers and feeding sites. Phytopathology. 102: 1079-85.
- Rehman, M., J.C. Melgar, J.M. Rivera, A.M. Idris y J.K. Brown. 2010. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" or Ca. *Liberibacter solanacearum*" associated with severe foliar chlorosis, curling, and necrosis, and tuber discoloration of potato plants in Honduras. Plant Dis. 94:376-377
- Richards, B.L y H.L. Blood. 1933. Psyllid yellow of the potato. Journal Agronomy Research. 46:189-216
- Ririe, K.M., R.P. Rasmussen y C.T. Wittwer. 1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Anal Biochem. 245: 154-60
- Schmittgen, T.D., B.A. Zakrajseka, A.G. Mills, V. Gorn, M.J. Singer y M.W. Reed. 2000. Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. Anal. Biochem. 285: 194-204
- Secor, G.A. y V.V. Rivera. 2004. Emerging disease of cultivated potato and their impact on Latin America. Rev. Latinoamericana de la Papa (Suppl.). 1-8.

- Secor, G.A., V.V. Rivera, J.A. Abad, G.R.G Clover, L.W. Liefting y X. Li. 2009. Association of *Candidatus Liberibacter solanacearum* with zebra chips disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy and PCR. *Plant Dis.* 93:574-583
- Servicio Metereologico Nacional. 2017. <http://smn.cna.gob.mx/>
- Tanaka, F.A., H.D. Coletta, K.C. Alves, M. Spinelli, M.A. Machado y E.W. Kitajima. 2007. Detection of the "*Candidatus Liberibacter americanus*" in phloem vessels of experimentally infected *cataranthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatol Bras.* 32:519.
- Teixeira D.C., C. Saillard, C. Couture, E.C. Martins, N.A. Wulff, S.E. Jagoueix, P.T Yamamoto, A.J. Ayres y J.M. Bové. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol Cell Probes.* 22: 139-150
- Texeira, D.C., J. Ayres, E.W. Kitajima, L. Danet, S. Jagoueix, C. Saillard y J.M. Bóve . 2005. First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New Liberibacter Species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the Disease. *Plant Dis.* 89:107.
- Trumble, D. y J.T. Liu. 2006. Ovipositional preference, damage, thresholds, and detection of the tomato-potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: psyllidae) on selected tomato accessions. *B Entomol Res.* 96: 197-204.
- Tyler H.L., L.F.W. Roesch, S. Gowda, W.O Dawson y E.W. Triplett. 2009. Confirmation of the Sequence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and Assessment of Microbial Diversity in Huanglongbing-Infected Citrus Phloem Using a Metagenomic Approach. *Plant Dis.* 22:1624-34
- University of California. 2015. Disponible a partir de: <http://ucanr.edu/sites/>. Acceso 2015 Oct 21.

- Wang, N. and Trivedi P. 2013. Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. *Plant Dis.* 103: 652-665
- Wenbin, L., J.S. Hartung y L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglonbing. *J Microbiol Methods.* 66: 104-115.
- Wenbin, L., L. Laurene y J.S. Hartung. 2008. Quantitative distribution of "Candidatus *Liberibacter asiaticus*" in Citrus Plants with Citrus Huanglonbing. *Proc Am Philos Soc.* 99: 139-144.
- Wenbin, L., J.A Abad, D.F.M. Ronald, J. Rascoe, A. Wen, N.C Gudmestad, G.A Secor, L. Ming, D. Yongping y L. Lauren. 2009. Multiplex real time PCR for detection, identification and quantification of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in potato plants with zebra chips. *Journal of microbiology methods.* 78:59-65
- Wilhelm, J., y A. Pingoud. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem.* 4:1120-8.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen y T.L.Madden. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 18:134.

## Abreviaturas

°C	Grados celsius
µm	Micrómetros
16S	Componente de la subunidad pequeña (30s) de los ribosomas de procariontes
B. cockerelli	<i>Bactericera cockerelli</i>
Ca.	<i>Candidatus</i>
CLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
CLs	<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>
cm	Centímetros
cPCR	PCR convencional
Ct	Ciclo del umbral
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Da	Daltones
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato
E	Eficiencia de reacción de PCR
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EUA	Estados Unidos de América
H	Hora
H.R.	Humedad relativa
HLB	Huanglongbing
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobase
Km	Kilómetro
LB	Luria Bertani



M	Molaridad
Max	Máximo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
MIQE	Información mínima para la publicación de experimentos de PCR cuantitativa
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mpb	Millones de pares de bases nucleotídicas
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OA2	Primer forward para detección <i>Candidatus Liberibacter Solanacearum</i>
OD	Densidad óptica
OI2c	Primer reverse para detección <i>Candidatus Liberibacter Solanacearum</i>
OTB	Organismo tipo bacteria
pB	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
PMP	Punta morada de la papa
PT	Permanente del tomate
qPCR	PCR tiempo real
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación lineal

rARN	ácido ribonucleico ribosomal
rDNA	DNA ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
T	Temperatura
Taq	Enzima de <i>Thermus aquaticus</i> que amplifica ADN
Tris-HCl	molécula reguladora de pH
UC	Unidades calor
v/v	Volumen sobre volumen
ZC	Zebra chips