



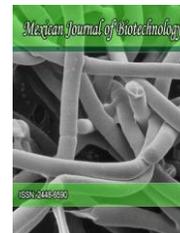
CICB  
Publisher

Research Centre for Biological Sciences  
(CICB), Autonomous University of  
Tlaxcala, Mexico. All rights reserved

**Mexican Journal of Biotechnology 2021, 6(2):86-102**

Journal homepage: [www.mexjbiotechnol.com](http://www.mexjbiotechnol.com)

ISSN:2448-6590



**SHORT COMMUNICATION**



**Antioxidant gene expression, chlorophyll, and starch content in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka Ex Q. Jiménez) trees with HLB by application of elicitors of plant resistance**

**Expresión de genes antioxidantes y contenido de clorofila y almidón en árboles de limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka Ex Q. Jiménez) con HLB bajo la aplicación de elicitores de resistencia**

Felipe Roberto Flores-de la Rosa<sup>1\*</sup>, Ricardo Santillán-Mendoza<sup>1</sup>, Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera<sup>1</sup>, Antonio Martínez-Ruiz<sup>2</sup>, Jacel Adame-García<sup>3</sup> & Mauricio Luna-Rodríguez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental Ixtacuaco. Carretera Federal Martínez de la Torre–Tlapacoyan, Ver. km 4.5. Congregación Rojo Gómez, Tlapacoyan, Veracruz, C.P. 93650, Mexico.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental San Martinito. Carretera Federal México-Puebla km 56.5, Santa Rita Tlahuapan, Puebla, C.P. 74100, Mexico.

<sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Úrsulo Galván. A El Paraíso S/N, Campestre, Úrsulo Galván, Veracruz, C.P. 91667, Mexico.

<sup>4</sup>Laboratorio de Genética e Interacción Planta Microorganismo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. Lomas del Estadio s/n, Xalapa, Veracruz, C.P. 91000, Mexico.

\*Corresponding author

E-mail address: [flores.felipe@inifap.gob.mx](mailto:flores.felipe@inifap.gob.mx) (F. R. Flores-de la Rosa).

Article history:

Received: 8 February 2021 / Received in revised form: 17 March 2021 / Accepted: / 19 March 2021 / Published online: 1 April 2021.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.2.86>

**ABSTRACT**

Persian lime is economically important for Mexico. However, the disease known as Huanglongbing (HLB) causes chlorosis symptoms in the foliage that affect the growth

and decreases the yield of the trees. The expression of chlorosis symptoms is associated with starch accumulation and inhibition of antioxidant activity. The objective of the present work was to determine the effect of the application of three resistance elicitors on the expression of three antioxidant genes and on starch and chlorophyll content in Persian lime trees with HLB. Salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) or gamma-aminobutyric acid (GABA) were applied every eight days for nine weeks using a completely randomized design and a one-way ANOVA was performed for the analysis. Expression of APX, CAT and SOD genes was quantified at week nine at four different times. Starch and total chlorophyll content was estimated every three weeks by spectrophotometric methods. The application of the elicitors significantly increased the expression of the three genes, with SA and GABA generating the greatest increase at different times of application. No difference was found in starch and total chlorophyll content at most of the times evaluated. The use of resistance elicitors is promising in the management of HLB in plots already infected, seeking to extend the productive life of the orchards and thus counteract the economic losses caused by HLB.

**Keywords:** Citrus greening, phytohormones, HLB management, carbohydrates accumulation.

## RESUMEN

El limón Persa es económicamente importante para México. Sin embargo, la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) ocasiona síntomas de clorosis en el follaje que afectan el crecimiento y disminuye el rendimiento de los árboles. La expresión de síntomas de clorosis se asocia a la acumulación de almidón y la inhibición de la actividad antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la aplicación de tres elicitores de resistencia en la expresión de tres genes antioxidantes y del contenido de almidón y clorofila en árboles de limón Persa con HLB. Se aplicaron ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) o ácido gamma-aminobutírico (GABA), la aplicación se realizó cada 8 días, durante nueve semanas usando un diseño completamente al azar y se realizó un ANOVA de una vía para el análisis. Se cuantificó la expresión de los genes *APX*, *CAT* y *SOD* en la semana nueve a cuatro diferentes tiempos. El contenido de almidón y clorofila total se estimó cada tres semanas mediante métodos espectrofotométricos. La aplicación de los elicitores incrementó significativamente la expresión de los tres genes, siendo SA y GABA los que generan un mayor incremento a diferentes tiempos de aplicado. No se encontró diferencia en el contenido de almidón y clorofila total en la mayoría de los tiempos evaluados. El uso de elicitores de resistencia es promisorio en el manejo del HLB en parcelas ya infectadas buscando extender la vida productiva de las huertas y de esta forma contrarrestar las pérdidas económicas causadas por el HLB.

**Palabras clave:** Reverdecimiento de los cítricos, fitohormonas, manejo de HLB, acumulación de carbohidratos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La citricultura es de importancia económica mundial. Sin embargo, desde hace algunos años a la fecha, esta industria está siendo afectada debido al reto que representa la

enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB), Dragón Amarillo o reverdecimiento de los cítricos (McCollum y Baldwin, 2016). Esta enfermedad es asociada al menos a tres especies diferentes del género *Candidatus Liberibacter* (Texeira *et al.*, 2007; Camacho-Tapia *et al.*, 2016; Fourie *et al.*, 2020). *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas) se encuentra diseminada en todas las regiones cítricas del mundo (Ajene *et al.*, 2020). En México, el HLB constituye la enfermedad de mayor importancia fitosanitaria y actualmente se encuentra distribuida en todo el país (Márquez-Pérez *et al.*, 2018).

México constituye el principal exportador de limón Persa en el mundo, hacia los mercados de USA, Japón y Europa (Mendoza-Tornez *et al.*, 2016). Tan solo para el año 2019, la producción total alcanzó más de 700 mil toneladas, lo cual representa una derrama de más de 4 mil millones de pesos (SIAP, 2020). A pesar de esto, en predios donde este cultivo está establecido se ha observado un rápido progreso temporal y espacial del HLB (Márquez-Pérez *et al.*, 2018), además, se ha documentado que esta enfermedad ocasiona pérdidas de hasta 2.4 ton/Ha de fruta de limón Persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

Debido a la naturaleza de CaLas, su aislamiento resulta muy complejo (Ha *et al.*, 2019; Merfa *et al.*, 2019), por lo que, para comprender mejor su capacidad infectiva y el desarrollo de la enfermedad, se ha utilizado un enfoque basado en genómica y bioinformática (Liu *et al.*, 2019; Flores-de la Rosa *et al.*, 2020). Esto ha permitido descubrir proteínas con actividad patogénica que actúan directamente sobre el cloroplasto y lo dañan estructuralmente (Pitino *et al.*, 2016), este daño genera los principales síntomas del HLB, clorosis y acumulación de almidón (Pitino *et al.*, 2018). Asimismo, se ha observado que la generación de daño en las plantas por CaLas está asociada al parasitismo energético por una acumulación de ATP (Hao *et al.*, 2019; Flores-de la Rosa *et al.*, 2021) y a la sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la planta, causada por la represión de los mecanismos antioxidantes de la misma (Pitino *et al.*, 2017) sin resultar esto en toxicidad a la bacteria por su capacidad de metabolizar esta Especie Reactiva de Oxígeno (Jain *et al.*, 2015).

Las estrategias de los programas de control del HLB incluyen principalmente técnicas de control de poblaciones del insecto vector de CaLas, *Diaphorina citri* K. (Iqbal *et al.*, 2020), sin embargo, los conocimientos generados de la interacción molecular entre CaLas y los cítricos hospedantes, sugieren que es posible activar los mecanismos de defensa de las plantas para incrementar su resistencia al ataque de la bacteria (Andrade *et al.*, 2020). Los brasinoesteroides y las estrigolactonas son fitohormonas promisorias para control de HLB debido a que actúan como elicitores de resistencia contra el HLB en cítricos dulces (Canales *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2018). Sin embargo, es necesario evaluar otras fitohormonas que han demostrado incrementar la actividad antioxidante y la capacidad de resistencia en diferentes especies vegetales. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de tres elicitores de resistencia en la expresión de genes antioxidantes y el contenido de almidón y clorofila en árboles de limón Persa infectados naturalmente con HLB.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Establecimiento del experimento

Se utilizaron árboles de limón Persa de cinco años de edad injertados sobre el portainjerto Citrumelo Swingle de cinco años de edad. Los árboles se plantaron en rectángulo a una distancia de 5x4 m (357 árboles por Ha), usando un diseño completamente al azar, en terrenos del Campo Experimental Ixtacuaco del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), el cual se ubica en las coordenadas N 20° 2' 35.48" y W 97° 5' 52.60".

### 2.2 Diagnóstico de HLB mediante PCR

Se realizó una búsqueda de plantas con síntomas asociados a HLB y corroboró si estaban infectados por HLB mediante el protocolo descrito por Lin *et al.* (2010). La extracción de ADN se realizó en base al protocolo descrito por Rodríguez-Quibrera *et al.* (2019), posteriormente, la integridad y concentración del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría nanodrop. La reacción de PCR anidada se realizó en un solo tubo con 2 µL de ADN de limón Persa, buffer de PCR 1X, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP's, 0.5 pmol de iniciadores externos (Las-O-F, Las-O-R) y 10 pmol de iniciadores internos (Las-I-F, Las-I-R) y 1.5 U de ADN polimerasa en un volumen final de 20 µL. Los iniciadores utilizados fueron: externos, Las-O-F (CGGTGAATGTATTAAGCTGAGGCGTTCC), Las-O-R (TACCCACAACAAAATGAGATACACCAACAACCTTC); internos, Las-I-F (CGATTGGTGTCTTGTAGCG) y Las-I-R (ACAATAGAAGGATCAAGCATCT). La primera ronda de amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C y 20 ciclos de 95 °C durante 30 s, 67 °C por 45 s y 72 °C durante 45 s, la segunda ronda consistió en 35 ciclos 95 °C durante 30 s, 57 °C por 45 s y 72 °C durante 45 s, se aplicó una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de la amplificación fue analizado en electroforesis horizontal de gel de agarosa al 1.8 % a 65 V durante 90 min.

### 2.3 Tratamiento con elicitores

Se seleccionaron tres árboles sintomáticos y confirmados por PCR para cada tratamiento y tres no sintomáticos negativos por PCR como control. Los tratamientos utilizados fueron: ácido salicílico (SA) 10 mM, ácido jasmónico (JA) 10 µM y ácido gamma-aminobutírico (GABA) 10 mM. Los elicitores fueron aplicados semanalmente durante nueve semanas.

### 2.4 Expresión de genes antioxidantes mediante PCR semicuantitativa

Para determinar el efecto de los elicitores en la actividad antioxidante de los árboles de limón Persa con HLB se estimó la expresión de los genes *APX*, *CAT* y *SOD* (Tabla 1) en la semana nueve y se utilizó el gen *actina* como control. Se colectaron hojas sintomáticas de cada tratamiento, se realizó una mezcla de las hojas y se maceró utilizando nitrógeno líquido, posteriormente se realizó la extracción de ARNm utilizando Trizol Reagent ® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la expresión de los genes al final del total de aplicaciones, en la semana nueve de aplicación, se extrajo RNA 1h, 5h, 24h y 72h posteriores a la aplicación del tratamiento.

Para la amplificación de los genes evaluados, se utilizó el protocolo descrito por Pitino *et al.* (2017), los iniciadores empleados se encuentran enlistados en la tabla 1. Para realizar la RT-PCR semicuantitativa se utilizó un sistema One-Step de retrotranscripción y amplificación en un solo tubo, usando como templado 300 ng de RNAm purificado. El ciclo térmico utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 28 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 45 s, anillamiento a 60 °C por 35 s, extensión a 72 °C por 35 s y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de RT-PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.0% a 90 V durante 30 min y los geles fueron analizados mediante un fotodocumentador en luz UV. El análisis de densitometría óptica de cada producto de RT-PCR fue cuantificado mediante el software ImageJ.

**Tabla 1.** Iniciadores utilizados en este estudio para el análisis de la expresión génica de genes antioxidantes en limón Persa.

**Table 1.** Primers used in this study for the analysis of antioxidant gene expression in Persian lime.

Gen	Iniciador F	Iniciador R	Referencia
<i>Actina</i>	CCCTTCCTCATGCCATTCTTC	CGGCTGTGGTGGTAAACATGT	Mafra <i>et al.</i> , 2012
<i>APX</i>	GAGGCAAGTCTTTGGTGCTC	GGAAAACAGGGTCATCCAGA	Pitino <i>et al.</i> , 2017
<i>CAT</i>	TATCCGTATTTGGCGGAGTC	CCATAGTTAGGGCCGTCAAA	Pitino <i>et al.</i> , 2017
<i>SOD</i>	GGAATGACATCCCCATCATC	TTGGGTTTCGCCTAAATTCAC	Pitino <i>et al.</i> , 2017

## 2.5 Estimación del contenido de almidón y clorofila

Tres hojas maduras fueron colectadas aleatoriamente de cada árbol sano, mientras que en árboles enfermos se colectaron tres hojas con síntomas visibles cada tres semanas posteriores a la aplicación de los elicitores por un periodo de nueve semanas (S3, S6, S9). Una vez colectadas fueron colocadas inmediatamente en papel aluminio para que permanecieran en oscuridad, en seguida se pusieron en bolsas de plástico dentro de una hielera con geles congelantes. El tejido fue pesado, molido con nitrógeno líquido y separado en dos tubos, el primero para determinar el contenido de clorofila y el segundo para determinar el contenido de almidón. El contenido de almidón se estimó de acuerdo con los protocolos descritos por Zheng *et al.* (2018) con ligeras adecuaciones en donde, 100 mg de tejido de hojas frescas fueron molidos con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a un microtubo de 2 ml que contenía 1 ml de agua destilada, en seguida se agitó en vortex a máxima velocidad por 1 min, posteriormente el homogeneizado se hirvió por 10 min en un baño de agua; transcurrido el tiempo, se enfrió por inmersión en agua fría (4 °C) por 2 min. Las muestras fueron agitadas en vortex y centrifugadas a 2000 g por 2 min, 300 µl de sobrenadante fueron transferidos a un tubo nuevo a los cuales se les adicionaron 900 µl de etanol del 96°. La mezcla se homogenizó con vortex y se centrifugó por 10 min a 10000 g. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió la pastilla en agua destilada estéril. En seguida se añadieron 15 µl de KI:I<sub>2</sub> (8 mM:50 mM) y se incubaron por 15 min antes de realizar las lecturas. La cuantificación de almidón fue realizada en un

espectrofotómetro UV/VIS SPECTROPHOTOMETER a 594 nm, en donde, almidón de arroz fue utilizado como standard.

El contenido total de clorofila, clorofila-*a* y clorofila-*b* fue determinado a partir de tejido de hojas de limón sin nervaduras, utilizando el protocolo de Das *et al.* (2019), brevemente, 500 mg de tejido fresco fue molido con nitrógeno líquido, el tejido molido fue colocado en un tubo cónico de 15 ml, en seguida se le adicionaron 12.5 ml de acetona alcalina al 80 % (0.1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (v/v) y se colocó en oscuridad por 24 h para la extracción de la clorofila. Transcurrido el tiempo, el contenido de clorofila fue estimado mediante la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS SPECTROPHOTOMETER a unas longitudes de onda de 645 y 663 nm. Los cálculos fueron realizados de acuerdo con la fórmula de Arnon (1949), la cual se describe a continuación:

$$\text{Clorofila Total} = [20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})] \times V / 1000 \times 1/W$$

V= volumen final del extracto de clorofila en acetona al 80 %.

W= peso fresco de tejido de hojas en gramos.

A= valores de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro.

El contenido de clorofila fue expresado en mg de clorofila por gramo de peso fresco.

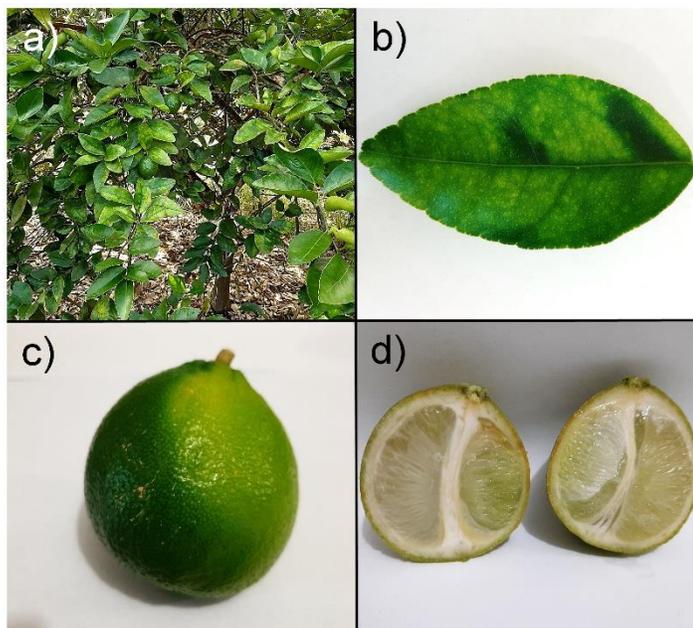
## 2.6 Análisis de datos

Se utilizó el programa STATISTICA ver 8.0 para analizar los resultados de los experimentos presentados mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía tomando en cuenta el error estándar y realizando una prueba DMS (diferencias mínimas significativas). La diferencia estadística de los tratamientos con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ) es indicada encima de las barras en las gráficas.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Detección de árboles de limón Persa positivos a HLB

Los síntomas observados en la parcela del experimento corresponden con los que han sido reportados para otros cítricos infectados con HLB (Fig. 1). La prueba de detección mediante PCR anidada permitió corroborar que los síntomas fueron ocasionados por la presencia de CaLas, mientras que las plantas que no mostraban ningún tipo de síntoma fueron negativas a las pruebas de detección de la bacteria.

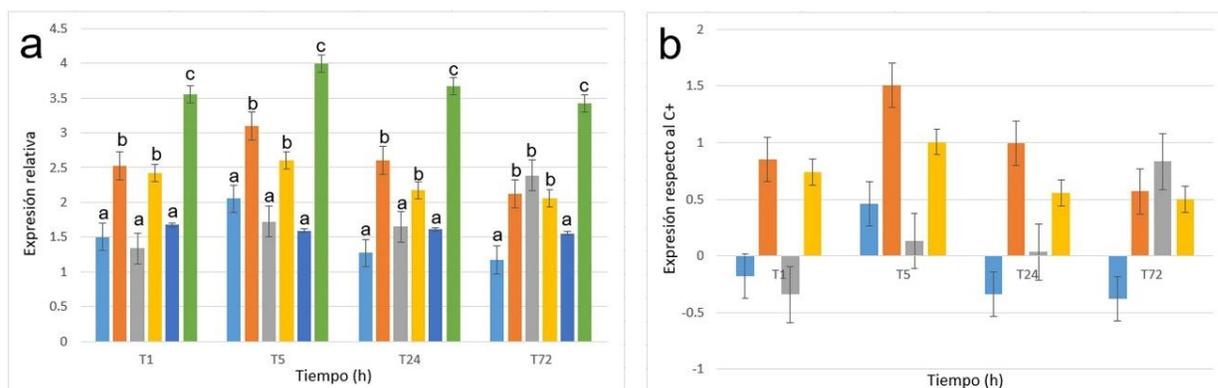


**Fig. 1.** Síntomas de HLB observados en los árboles de limón Persa. Clorosis bien marcada en las hojas de ramas de los árboles (a), así como los islotes verdes sectores de las hojas (b) deformación de frutos (c), sección longitudinal mostrando deformación de la columnela del fruto (d).

**Fig. 1.** Observed symptoms in the study plot. Chlorotic zones well defined in the tree branches (a), as well as the characteristic green islets of the disease on the leaves (b), the fruits show deformed as well is reported for HLB (c) especially in a transversal cut.

### 3.2 Efecto en la expresión de genes antioxidantes

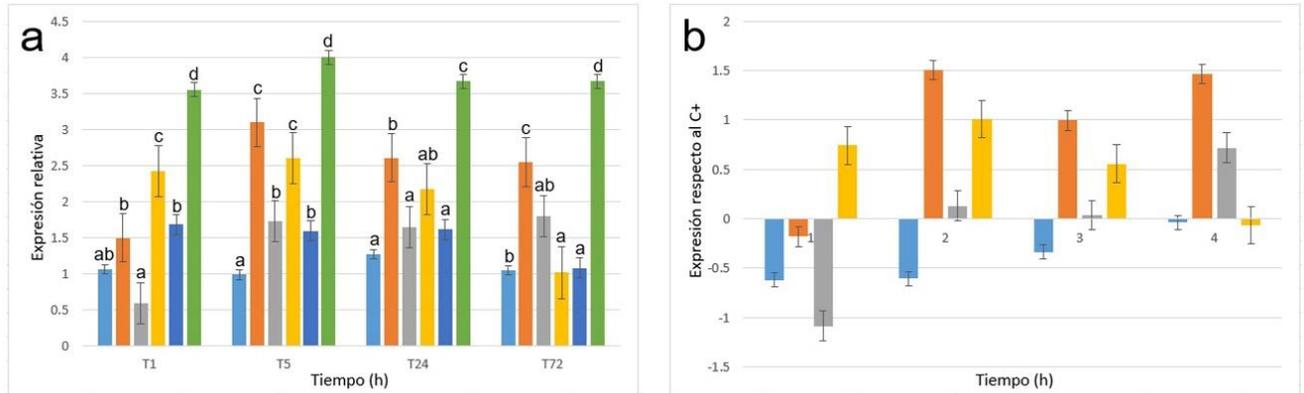
Los genes evaluados en el presente trabajo mostraron un incremento en su expresión a diferentes tiempos de acuerdo con los elicitores utilizados. El gen *APX* mostró un rápido incremento en su actividad cuando se aplicó SA y JA, incrementando su expresión desde 1h, sin embargo, su mayor expresión relativa se observó 5h posteriores a la aplicación (Fig. 2a), y aunque disminuyó en los demás tiempos, se mantuvo en un nivel mayor que el testigo positivo sin tratamiento (Fig. 2a) pero menor que el testigo sano. Cuando se aplicó GABA, el gen *APX* se vio reprimido a 1h posterior de la aplicación, sin embargo, a 72h se observó que la actividad del gen fue mayor con respecto al control positivo sin tratamiento y los tratamientos con SA y JA (Fig. 2b).



**Fig. 2.** Efecto de la aplicación de tres elicitores de resistencia en la expresión relativa del gen *APX* en limón Persa infectado con HLB (a) y la comparativa en expresión con el control infectado sin tratamiento (C+) a diferentes tiempos (b). Los tratamientos fueron: plantas positivas con agua estéril (azul claro), SA (naranja), GABA (gris), JA (amarillo), control positivo sin tratamiento (azul oscuro) y control de planta sana (verde). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 2.** Effect of application of three resistance elicitors in relative *APX* gene expression in Persian lime infected with HLB (a) and expression comparison with infected non-treated control (C+) at different times (b). Treatments were positives plants with sterile water (light blue), SA (orange), GABA (gray), JA (yellow), non-treated positive control (dark blue) and healthy control (green). Different letters statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

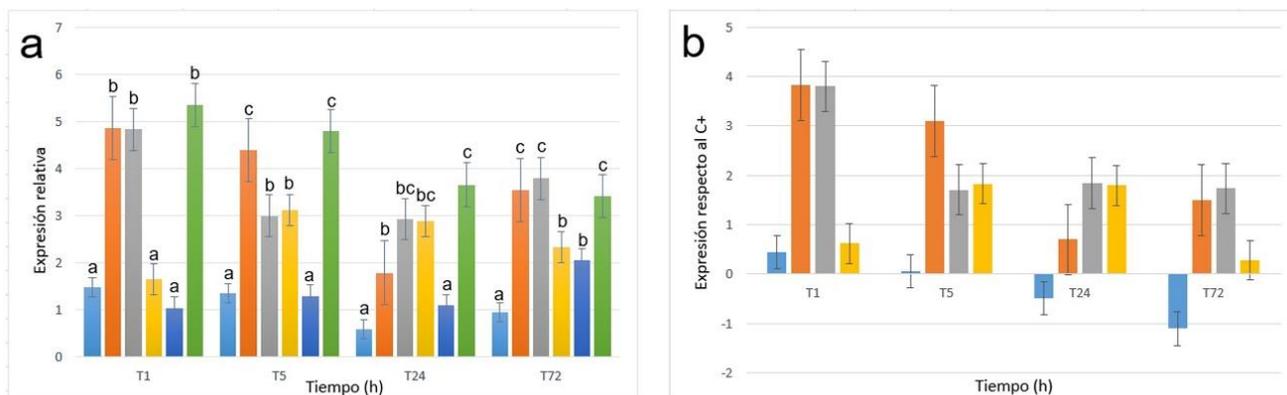
Al respecto del gen *CAT* se observó un comportamiento similar al del gen *APX* con la aplicación de SA y JA, pues la expresión de *CAT* se incrementó desde 1h posterior a la aplicación de estos elicitores, siendo mayor a las 5h, sin embargo, el nivel de expresión no alcanzó al testigo sano. En el caso de la aplicación de JA, la expresión de *CAT* se incrementó desde el primer tiempo, teniendo un pico a las 5h, pero disminuyó drásticamente entre las 24h y 72h, mientras que para el SA se mantuvo constante (Fig. 3A). En el caso de GABA, nuevamente, la inducción de la expresión fue tardía, mostrando su mayor nivel de expresión a las 72h (Fig. 2E).



**Fig. 3.** Efecto de la aplicación de tres elicitores de resistencia en la expresión relativa del gen *CAT* en limón Persa infectado con HLB (a) y la comparativa en expresión con el control infectado sin tratamiento (C+) a diferentes tiempos (b). Los tratamientos fueron: plantas positivas con agua estéril (azul claro), SA (naranja), GABA (gris), JA (amarillo), control positivo sin tratamiento (azul oscuro) y control de planta sana (verde). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 3.** Effect of application of three resistance elicitors in relative *CAT* gene expression in Persian lime infected with HLB (a) and expression comparison with infected non-treated control at different times (b). Treatments were positive plants with sterile water (light blue), SA (orange), GABA (gray), JA (yellow), non-treated positive control (dark blue) and healthy control (green). Different letters statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

Por último, se determinó el efecto de los elicitores en la expresión del gen *SOD*. Para este gen, la expresión se vio rápidamente incrementada ante la aplicación del SA (Fig. 4A), alcanzando el mismo nivel de expresión que el testigo sano a 1h posterior a la aplicación, la expresión fue disminuyendo con el paso del tiempo, sin embargo, fue siempre estadísticamente igual al testigo sano, excepto a 24h posterior a la aplicación. Al aplicar GABA, la respuesta temprana de este gen se iguala al testigo sano en tres de los tiempos evaluados. La aplicación de JA mostró su mayor nivel de expresión a las 5h, siendo siempre menor que con SA y GABA, pero mayor respecto al control positivo sin tratamiento (Fig. 4B).

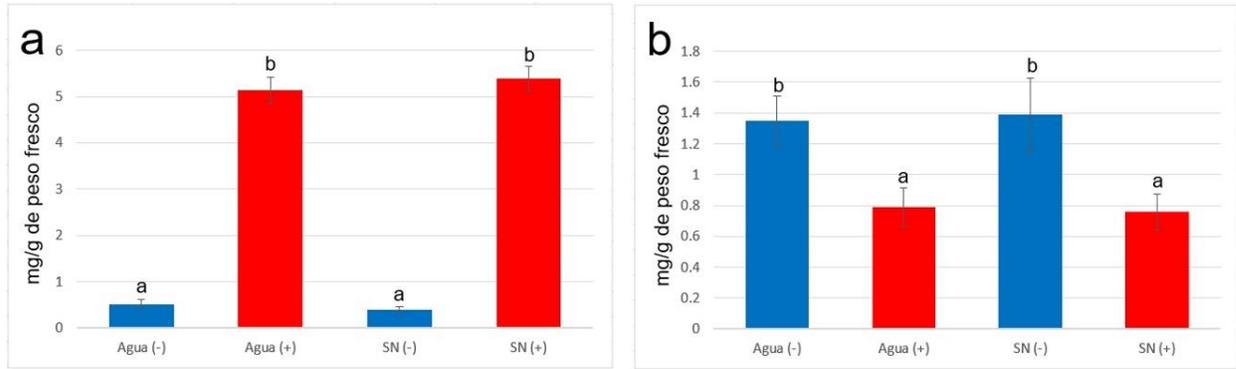


**Fig. 4.** Efecto de la aplicación de tres elicitors de resistencia en la expresión relativa del gen *SOD* en limón Persa infectado con HLB (A) y la comparativa en expresión con el control infectado sin tratamiento (B) a diferentes tiempos. Los tratamientos fueron: plantas positivas con agua estéril (azul claro), SA (naranja), GABA (gris), JA (amarillo), control positivo sin tratamiento (azul oscuro) y control de planta sana (verde). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 4.** Effect of application of three resistance elicitors in relative *SOD* gene expression in Persian lime infected with HLB (A) and expression comparison with infected non-treated control (B) at different times. Treatments were positive plants with sterile water (light blue), SA (orange), GABA (gray), JA (yellow), non-treated positive control (dark blue) and healthy control (green). Different letters statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 Contenido de almidón y clorofila

La comparación entre plantas sanas y plantas enfermas demostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de almidón y clorofila. En condiciones normales (sin aplicación de inductores de resistencia), los resultados obtenidos mostraron un aumento de aproximadamente 10 a 12 veces en el contenido de almidón en los árboles de limón Persa con HLB con respecto a los árboles sin HLB (Fig. 5a), mientras que, los resultados obtenidos, mostraron una disminución de aproximadamente el 90% en el contenido de clorofila en los árboles de limón Persa enfermos respecto a los sanos (Fig. 5b).



**Fig. 5.** Contenido de almidón (a) y clorofila total (b) en plantas de limón Persa infectadas con HLB (+) y sanas (-), con aplicación de agua estéril o sin ningún tratamiento (SN). Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**Fig. 5.** Starch (a) and total chlorophyll (b) content among infected with HLB (+) and healthy (-) Persian lime plants treated with sterile water or non-treated. Different letters statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 2.** Efecto de la aplicación de elicitores de resistencia en el contenido de almidón y clorofila en árboles de limón Persa infectados con HLB a las tres (S3), seis (S6) y nueve (S9) semanas de aplicación de los elicitores. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**Table 2.** Effect of the application of resistance elicitors in the starch and chlorophyll content in Persian lime trees infected with HLB at three (S3), six (S6) and nine (S9) weeks of application. Different letters statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

Elicitor	Contenido de almidón (mg/g de peso fresco)			Contenido de clorofila (mg/g de peso fresco)		
	S3	S6	S9	S3	S6	S9
SA	3.6631b	6.2126b	4.7373b	1.02b	0.93c	0.63c
GABA	3.7074b	5.3724b	4.8618b	1.06b	1.07b	1.10b
JA	5.1282c	6.2160b	4.6398b	0.76c	0.79c	0.93b
Agua (+)	4.8396c	5.4168b	5.1504b	0.89c	0.85c	0.57c
SN(+)	5.1948c	5.9718b	5.0172b	0.85c	0.78c	0.82c
SN(-)	0.4652a	0.6421a	0.4398a	1.22a	1.22a	1.22a

El contenido de almidón se vio disminuido respecto al control sin tratamiento por la aplicación de GABA y SA en la semana tres de aplicación, sin embargo, esto fue revertido hacia el resto de las semanas evaluadas, mientras que el JA no mostró ningún efecto en el contenido de almidón en ningún tiempo evaluado. Para el caso del

contenido de clorofila total, la aplicación de GABA mostró tener un efecto al incrementar el contenido con una tendencia ascendente durante todo el tiempo de evaluación, mientras que el JA y el SA no mostraron ninguna variación significativa. Los resultados de esta evaluación se resumen en la tabla 2.

#### 4. DISCUSIÓN

La infección por la bacteria *CaLas*, causante del HLB, ocasiona un gran número de alteraciones fisiológicas en las plantas. Entre estas, la generación de estrés oxidativo causado por la supresión de la expresión de los genes codificantes de enzimas antioxidantes (Pitino *et al.*, 2017), por lo cual, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de tres fitohormonas, con actividad como elicitores de resistencia, sobre la expresión de los genes *APX*, *CAT* y *SOD* en plantas de limón Persa infectadas con HLB.

Los resultados de este trabajo muestran que la aplicación de los elicitores coadyuva al incremento en la expresión de los genes en estudio, sin embargo, el momento en que se incrementa la expresión génica difiere para cada uno de los elicitores empleados. El SA y JA se han asociado a la respuesta de defensa de los cítricos ante la interacción con *CaLas* y su vector, respectivamente. El uso de SA en cítricos, se ha relacionado con el incremento de auxinas, proteínas PR y factores de transcripción WRKY (Nehela *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la ruta de SA, en cultivares altamente susceptibles, es reprimida, mientras que la de JA, se incrementa durante la infección por HLB (Xu *et al.*, 2015). La represión de las rutas de defensa mediadas por SA se atribuye a la actividad de la enzima ácido salicílico-hidroxilasa presente en *CaLas* (Li *et al.*, 2017) y otras especies de *Ca. Liberibacter* (Wang *et al.*, 2017). Además, se ha observado que algunos efectores de patogenicidad de *CaLas*, como la proteína Las5315, atacan directamente al cloroplasto, causando clorosis y acumulación de almidón (Pitino *et al.*, 2018), dichos efectores contienen dominios altamente relacionados con la anhidrasa  $\beta$ -carbónica (Flores-de la Rosa *et al.*, 2020), la cual es necesaria para la percepción y activación de resistencia mediada por SA (Medina-Puche *et al.*, 2017), por lo cual, estos efectores podrían estar relacionados también con la represión de la defensa inducida por SA endógeno.

En el estudio reportado por Li *et al.* (2017), la aplicación exógena foliar de una solución de SA 1mM indujo un incremento en la actividad de genes relacionados con la defensa y en la concentración de SA endógeno en cítricos infectados con *CaLas*. En este trabajo se utilizó una concentración de SA mayor, de 10 mM, y se observó un importante incremento en la actividad de genes antioxidantes y un efecto favorable parcial en el contenido de almidón y clorofila en árboles de limón Persa con HLB. El efecto de la aplicación exógena de SA en la expresión de genes antioxidantes en cítricos ha sido previamente documentado (Oliveira-Coqueiro *et al.*, 2015), además, el incremento en la expresión de los tres genes evaluados en este trabajo fue previamente relacionada también con la disminución de la carga bacteriana de *CaLas* y síntomas de HLB en cítricos dulces, por la aplicación de otros elicitores (Canales *et al.*, 2016).

Respecto a la distribución y concentración de carbohidratos, en cítricos infectados con HLB, se ha reportado que la aplicación de estrigolactonas disminuye significativamente el contenido de almidón y glucosa (Zheng *et al.*, 2018). En el presente trabajo, con el uso de SA y GABA, se registró un efecto parcial en el contenido de almidón en plantas de limón Persa con HLB, sin embargo, es necesaria una evaluación más prolongada para corroborar el efecto que los elicitores tienen en el contenido de almidón y azúcares.

Recientemente, se concluyó que CaLas es un parásito de ATP (Flores-de la Rosa *et al.*, 2021), lo cual parece estar conectado con un incremento en el metabolismo del  $\alpha$ -cetoglutarato y la consecuente acumulación de GABA en el citosol, el cual se conecta con el ciclo de Krebs mediante la enzima GABA permeasa e incrementa la acumulación de productos del ciclo antes mencionado (Nehela y Killiny, 2019). Sin embargo, la acumulación de GABA en respuesta al estrés en plantas ha sido observada y la activación de defensa mediante este aminoácido no proteico es de interés debido a que no representa un gasto energético importante para la planta, a pesar de esto, los mecanismos por los cuales se activan las defensas, aún constituye un enigma (Vijayakumari *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la aplicación exógena de GABA en plantas de limón Persa con HLB incrementa la actividad de los genes antioxidantes evaluados, esto concuerda con lo reportado en otras plantas (Chen *et al.*, 2018) y sugiere que la aplicación exógena de GABA podría activar directamente las defensas de la planta, evitando ser aprovechada por CaLas, lo cual necesita una investigación más profunda.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la aplicación exógena de GABA y SA incrementa la expresión de genes codificantes de enzimas antioxidantes en limón Persa con HLB, este incremento se observa a diferentes tiempos posteriores a la aplicación. Respecto al contenido de clorofila y almidón, se observa un efecto parcial favorable al aplicar GABA y SA, sin embargo, estudios adicionales son necesarios para determinar el efecto que la aplicación de estos elicitores tiene a largo plazo (Trinidad-Cruz *et al.*, 2019) y la influencia que la edad y el avance de la infección tiene en la eficacia de los elicitores (Li *et al.*, 2016) en plantas infectadas con CaLas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Fondo FIDEICOMISO INIFAP por el financiamiento del proyecto: Evaluación de agentes elicitores de resistencia sistémica y actividad antioxidante en cítricos como medida de protección ante el HLB (No. Proyecto 1210034811). Se agradece a Pedro D. Bastián Vázquez y a Cristian Matilde Hernández por su apoyo en la parte técnica y de campo de este trabajo.

## **CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

## REFERENCIAS

- Ajene, I.J., Khamis, F., van Asch, B., Pietersen, G., Amondi, B.R., Ekesi, S., & Mohammed, S. 2020. Habitat suitability and distribution potential of *Liberibacter* species (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and “*Candidatus Liberibacter africanus*”) associated with citrus greening disease. *Diversity and Distributions* 26(5): 575 – 588.
- Andrade, M., Li, J., & Wang, N. 2020. *Candidatus Liberibacter asiaticus*: virulence traits and control strategies. *Tropical Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00341-0>
- Arnon, D.I. 1949. Copper Enzyme in Isolated Chloroplast. *Plant Physiology* 24:1 – 15.
- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martínez, R. I., Rebollar-Alviter, A., Aranda-Ocampo, S., & Suárez-Espinoza, J. 2016. Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 22(1): 5-16. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.09.021>
- Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., Rodríguez-García, M., López, Y., Aranguren, M., Alonso, E., Delgado, R., Luis, M., Batista, L., Paredes, C., Rodríguez, M., Pujol, M., Ochagavía, M.E., Falcón, V., Terauchi, R., Matsumura, H., Ayra-Pardo, C., Llauger, R., Pérez, M.C., Nuñez, M., Borrusch, M.S., Walton, J.D., Silva, Y., Pimentel, E., Borroto, C., & Borrás-Hidalgo, O. 2016. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, Causal Agent of Citrus Huanglongbing, Is Reduced by Treatment with Brassinosteroids. *PLoS ONE* 11(1): e0146223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146223>
- Chen, H., Liu, T., Xiang, L., Hu, L., & Hu, X. 2018. GABA Enhances Muskmelon Chloroplast Antioxidants to Defense Salinity-Alkalinity Stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 65(5): 674 – 679. <https://doi.org/10.1134/S1021443718050047>
- Das D., Seal P., & Biswas A.K. 2019. Influence of selenium on growth, antioxidants production and physiological parameters of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings and its possible reversal by coapplication of sulphate. *American Journal of Plant Sciences* 10:2236 – 2278. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.1012158>
- Flores-de la Rosa, F. R., Rodríguez-Quibrera, C. G., & Santillán-Mendoza, R. 2021. Phylogeny of ATP/ADP translocase gene from *Candidatus Liberibacter* spp., causal agents of HLB. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(1) <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-1>
- Flores-de la Rosa, F. R., Rodríguez-Quibrera, C. G., Matilde-Hernández, C., & Santillán-Mendoza, R. 2020. Bioinformatic Analysis of Potential Pathogenicity Effectors of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Causal Agent of Citrus Huanglongbing. *American Journal of Plant Science* 11: 1319-1330. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.118094>
- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G. & Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.

- Fourie, P.H., Kirkman, W., Cook, G., Steyn, C., de Bruyn, R., Bester, R., Roberts, R., Bassimba, D.D.M., José, C.M., & Maree, H.J. 2020. First Report of '*Candidatus Liberibacter africanus*' Associated with African Greening of *Citrus* in Angola. *Plant Disease* <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1392-PDN>
- Ha, T. P., He, R., Killiny, N., Brown, J. K., Omsland, A., Gang, D. R., & Beyenal H. Host-free biofilm culture of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*," the bacterium associated with Huanglongbing. *Biofilm* 1: 100005. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100005>
- Hao, G., Ammar, D., Duan, Y., & Stover E. 2019. Transgenic citrus plants expressing a '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' prophage protein LasP235 display Huanglongbing-like symptoms. *Agri Gene* 12: 100085. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2019.100085>
- Iqbal, J., Nazeer Hussani, H., Latif, M., Barjees Baig, M., Owayss, A.A., Raweh, H.S., & Alqarni, A.S. 2020. A field study investigating the insecticidal efficacy against *Diaphorina citri* Kuwayama on Kinnow mandarin, *Citrus reticulata* Blanco trees. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27(5): 1237 – 1241 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.006>
- Jain, M., Fleites, L.A., & Gabriel, D.W. 2015. Prophage-Encoded Peroxidase in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Is a Secreted Effector That Suppresses Plant Defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 28(12): 1330 – 1337. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-15-0145-R>
- Li, J., Pang, Z., Trivedi, P., Zhou, X., Ying, X., Jia, H., & Wang, N. 2017. "*Candidatus Liberibacter asiaticus* encodes a Functional Salicylic Acid (SA) Hydroxylase that degrades SA to suppress plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 30(8): 620 – 630. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0257-R>
- Li, J., Trivedi, P., & Wang, N. 2016. Field Evaluation of Plant Defense Inducers for the Control of Citrus Huanglongbing. *Phytopathology* 106: 37 – 46. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0196-R>.
- Lin, H., Chen, C., Doddapaneni, H., Duan, Y., Civerolo, E.L., Bai, X., & Zhao, X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 81: 17 – 25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>
- Liu, X., Fan, Y., Zhang, C., Dai, M., Wang, X., & Li, W. 2019. Nuclear Import of a Secreted "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" Protein is Temperature Dependent and Contributes to Pathogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Microbiology* 10: 1684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01684>
- Mafra, V., Kubo, K.S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R.M., Boava, L.P., Rodrigues, C.M., & Machado, M.A. 2012. Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. *PLoS ONE* 7(2): e31263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031263>
- Márquez-Pérez, F. J., Flores-Sánchez, J. L., Rodríguez-Mejía, L., Márquez Gómez, J., Michereff, S. J., Ancona, V., Robles-Bermúdez, A., & Domínguez-Monge, S. 2018.

- Progress and spatial pattern of huanglongbing in Persian lime in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 5(2), e351. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.05.02.01>
- McCollum, G., & Baldwin, E. 2016. Huanglongbing: Devastating Disease of Citrus. In *Horticultural Reviews* Volume 44, J. Janick (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781119281269.ch7>
- Medina-Puche, L., Castelló, M.J., Canet, J.V., Lamilla, J., Colombo M.L., & Tornero, P. 2017.  $\beta$ -carbonic anhydrases play a role in salicylic acid perception in Arabidopsis. *PLoS ONE* 12(7): e0181820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181820>
- Mendoza-Tornez, R., Marquez-Berber, S.R., Almaguer-Vargas, G., Aguilar-Ávila, J., Gardezi, A.K., Ayala-Garay, A.V. 2016. Value Network of the Persian lime in Mexico. *AGROFOR International Journal* 1(3): 39 – 45. <https://doi.org/10.7251/AGRENG1603039T>
- Merfa, M.V., Pérez-López, E., Naranjo, E., Jain, M., Gabriel, D.W., & de la Fuente, L. 2019. Progress and Obstacles in Culturing ' *Candidatus Liberibacter asiaticus*', the Bacterium Associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 109(7): 1092 – 1101. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0051-RVW>
- Nehela, Y., & Killiny, N. 2019. ' *Candidatus Liberibacter asiaticus*' and Its Vector, *Diaphorina citri*, Augment the Tricarboxylic Acid Cycle of Their Host via the  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Shunt and Polyamines Pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions* 32(4): 413 – 427. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-18-0238-R>
- Nehela, Y., Hijaz, F., Elzaweely, A.A., El-Zahaby, H.M., & Killiny, N. 2018. Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 102: 24 – 35. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.004>
- Oliveira-Coqueiro, D.S., Alves de Souza, A., Takita, M.A., Munari Rodrigues, C., Takeshi Kishi L., & Machado, M.A. 2015. Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid. *BMC genomics* 16:288. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1440-5>
- Pitino, M., Allen, V., & Duan, Y. 2018. Las $\Delta$ 5315 Effector Induces Extreme Starch Accumulation and Chlorosis as Ca. *Liberibacter asiaticus* Infection in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 9: 113 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00113>
- Pitino, M., Armstrong, C. M., Cano, L. M., & Duan, Y. 2016. Transient Expression of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* Effector Induces Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 6(7): 982 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00982>
- Pitino, M., Armstrong, C.M., & Duan, Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrus plants in response to ' *Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *Horticultural Research* 4:17040 <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>

Rodriguez-Quibrera, C.G., Flores-de la Rosa, F.R., López-Sosa, C.G., Adame-García, J., & Hernández-Guerra, C. 2019. Detección de CLas mediante la evaluación de iniciadores específicos en árboles de limón Persa en Veracruz. En: Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo Rural, Transferencia de Tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos Naturales y Cambio Climático pp. 2438 – 2454.

Rosales, R., & Burns J.K. 2011. Phytohormone changes and carbohydrate status in sweet orange fruit from Huanglongbing-infected trees. *Journal of Plant Growth Regulation* 30:312 – 321. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9193-0>

Texeira, D.C., Ayres, J., Kitajima, E.W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bové, J.M. 2007. 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 Disease* 89(1): 107 <https://doi.org/10.1094/PD-89-0107A>

Trinidad-Cruz, J.R., Rincón-Enriquez, G., Quiñones-Aguilar, E.E., Arce-Leal, A.P., Leyva-Lopez, N.E. 2019. Inductors of plant resistance in the control of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) trees. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(2):304 – 317. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1901-1>

Vijayakumari, K., Jisha, K.C., & Puthur, J.T. 2016. GABA/BABA priming: a means for enhancing abiotic stress tolerance potential of plants with less energy investments on defense cache. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:230. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2254-z>

Wang, N., Pierson, E.A., Setubal, J.C., Xu, J., Levy, J.G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L.T., & Martin, J.J. 2017. The *Candidatus Liberibacter*-Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. *Annual Review of Phytopathology* 4(55): 451 – 482. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035513>

Whitaker D.C., Giurcanu M.C., Young L.J., González P., Etxeberria E., Roberts P., Hendricks K., & Roman F. 2014. Starch content of citrus leaves permits diagnosis of Huanglongbing in the warm season but not cool season. *HortScience* 49:757 – 762. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.6.757>

Xu, M., Li, Y., Zheng, Z., Dai, Z., Tao, Y., & Deng, X. 2015. Transcriptional analyses of mandarins seriously infected by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *PLoS ONE* 10(7): e0133652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133652>.

Zheng, Y., Kumar, N., Gonzalez, P., & Etxeberria, E. 2018. Strigolactones restore vegetative and reproductive developments in Huanglongbing (HLB) affected, greenhouse-grown citrus trees by modulating carbohydrate distribution. *Scientia Horticulturae* 237: 89 – 95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.017>