



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN BOTÁNICA

## ESTUDIO DE MOLÉCULAS SEÑAL EN EL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS DE PAPA INFECTADAS CON *CANDIDATUS* LIBERIBACTER Y SU ASOCIACIÓN CON LAS RELACIONES HÍDRICAS

RICARDO MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

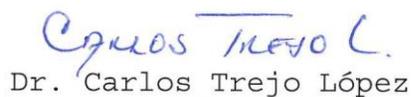
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Ricardo Martínez Gutiérrez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Carlos Trejo López, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Estudio de moléculas señal en el estrés oxidativo en plantas de papa infectadas con Candidatus liberibacter y su asociación con las relaciones hídricas.

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 16 de Noviembre de 2017



Firma del  
Alumno (a)



Dr. Carlos Trejo López

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Estudio de moléculas señal en el estrés oxidativo en plantas de papa infectadas por *Candidatus Liberibacter* y su asociación con las relaciones hídricas**, realizada por el alumno: **M en C. Ricardo Martínez Gutiérrez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A) Carlos Trejo L.  
DR. CARLOS TREJO LÓPEZ

DIRECTOR [Signature]  
DR. HUMBERTO ANTONIO LÓPEZ DELGADO

ASESOR (A) [Signature]  
DRA. MARTHA ELENA MORA HERRERA

ASESOR (A) [Signature]  
DR. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEÓN

ASESOR (A) [Signature]  
DRA. EMMA ZAVALETA MEJIA

ASESOR (A) [Signature]  
DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

ESTUDIO DE MOLÉCULAS SEÑAL EN EL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS DE PAPA INFECTADAS POR *CANDIDATUS LIBERIBACTER* Y SU ASOCIACIÓN CON LAS RELACIONES HÍDRICAS.

Ricardo Martínez Gutiérrez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

**RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del ácido salicílico (AS), dehidroascorbato (DHA) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como moléculas señal, en la respuesta al estrés oxidativo en plantas de *Solanum tuberosum* infectadas con *Candidatus Liberibacter* y en las relaciones hídricas de la planta. *Etapa 1:* Esquejes nodales de papa del clon 981819 infectadas con *Ca. Liberibacter* fueron incubados en  $H_2O_2$  o DHA posteriormente fueron subcultivados en medio MS convencional excepto el tratamiento con AS. A los 30 días se determinó la actividad enzimática de catalasa (CAT), peroxidasa (POX), calosa sintetasa, concentración de  $H_2O_2$ , acumulación de calosa, contenido relativo de clorofila, peso fresco y altura de la vitroplanta. *Etapa 2:* vitroplantas provenientes de la etapa 1, fueron trasplantadas en condiciones de invernadero para evaluar el efecto a largo plazo de las moléculas señal. A los 73 días después del trasplante (DDT) se les determinó las mismas variables de la etapa 1, la altura de la planta, diámetro del sexto entrenudo, conductancia estomática ( $g_s$ ), potencial hídrico ( $\Psi_A$ ), peso fresco y seco. A los 120 DDT se determinó el peso y número de minitubérculos. *Etapa 3:* vitroplantas infectadas con *Ca. Liberibacter* se trasplantaron a invernadero. Las plantas se asperjaron cada tercer día con AS,  $H_2O_2$  o DHA. Las variables analizadas y tiempos de evaluación fueron las mismas de la etapa 2. Resultados: etapa 1; las vitroplantas infectadas redujeron significativamente la

actividad de CAT, calosa sintetasa. La actividad de POX y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementaron significativamente respecto a las plantas no infectadas. Los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente la actividad de CAT en contraste con las plantas testigos infectadas. La acumulación de calosa y actividad de la calosa sintetasa incrementó por efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, similares al de las plantas no infectadas. Los tratamientos con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA incrementaron significativamente el peso fresco, longitud del tallo y contenido relativo de clorofila. En la etapa 2, el patógeno incrementó el  $\Psi_A$ , redujo la  $g_s$ , contenido relativo de clorofila el peso fresco, número y peso de minitubérculos significativamente. Los pretratamientos incrementaron el contenido relativo de clorofila; mientras que el AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redujeron la  $g_s$ , el DHA incrementó la  $g_s$  significativamente. El pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un incremento significativo en la altura del tallo, peso fresco, seco y contenido relativo de clorofila. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un incremento en el número de brotes de minitubérculos provenientes de plantas infectadas. En la etapa 3, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente la actividad de CAT; el AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el peso fresco, seco y altura, de las plantas. Los tratamientos incrementaron el peso de minitubérculos con respecto a las plantas testigos infectadas. Los resultados sugieren que CAT, POX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podrían estar involucrados en la síntesis de calosa mediada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones *in vitro*. El AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvieron efectos a largo y corto plazo atenuando los síntomas de la enfermedad de “Zebra chip” asociada a *Ca. Liberibacter*.

**Palabras clave:** *zebra chip, calosa sintetasa, acumulación de calosa, antioxidantes.*

SIGNAL MOLECULES STUDY IN THE OXIDATIVE STRESS ON POTATO PLANTS  
INFECTED BY *CADIDATUS* LIBERIBACTER AND THEIR ASSOCIATION WITH  
WATER RELATIONS

Ricardo Martínez Gutiérrez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

**ABSTRACT**

The aim of this research was to evaluate the effect of salicylic acid (AS), dehydroascorbate (DHA) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as signaling molecules in the oxidative response in *Solanum tuberosum* to stress caused by infection with *Candidatus* Liberibacter; as well as to know the effect of the pathogen on plant water relations.

*Phase 1:* 981819 potato clone single nodes infected with *Ca. Liberibacter solanacearum* were incubated for 1 hour in  $H_2O_2$  or DHA thereafter they were subcultured in Murashigie and Skoog propagation medium without any treatment. Another group of explants were cultured with MS propagation medium and added with SA. at 30 days the enzymatic activity of catalase (CAT), peroxidase (POX), calose synthase,  $H_2O_2$  content, callose accumulation, chlorophyll, fresh weight and plant height determinate. *Phase 2:* pretreated vitroplants from phase 1, were transplanted to pots and grown under greenhouse conditions to evaluate the long-term effect of SA, DHA and  $H_2O_2$ . At 73 days after transplantation (DAT) were determined all variables like pahse 1 experiement as well as, plant height, sixth internode diameter, stomatal conductance ( $g_s$ ) and plant water potential ( $\Psi_w$ ), fresh and dry weight. At 120 DAT minituber number and weight were determined. *Phase 3:* vitroplants non- infected or infected were transplanted to pots and grown under greenhouse conditions. Plants in greenhouse were sprayed twice a week from 30 DAT during the next 45 days with AS;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; or DHA. The enzymatic evaluation and physiological determination were similar as describe in phase 2. Results. Phase 1: infected vitroplants reduced CAT activity significantly as well as that callose synthase; while POX activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content increased significantly respect to no-infected vitroplants. AS, DHA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments significantly increased CAT respect to infected-control. The callose accumulation and callosa synthase activity significantly decreased in infected vitroplants respect to non-infected. However, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment increased callose synthase activity and accumulation at similar levels to non-infected vitroplants. AS, DHA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* treatments significantly increased fresh weight, stem length and chlorophyll content. Phase 2: *Ca. Liberibacter* increased  $\Psi_w$ , reduced  $g_s$ , relative chlorophyll content, fresh weight, minitubers number and weight in a meaningful way, whereas an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was observed mediated by a reduction in CAT activity. A long-term effect of DHA treatment in tuber weight,  $g_s$ , and chlorophyll content was observed. DHA treatment reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and increased CAT activity in infected plants showing an augmentation in minituber weight. Interestingly, a long term effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, significantly increased stem height, shoot fresh and dry weight, chlorophyll relative content and minitubers weight. Phase 3: SA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments significantly increased fresh and dry weight, stem height and sprouting number respect to infected control plants. It was noted that the SA, DHA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> had short and long-term promoted ameliorative symptoms in *Ca. Liberibacter* infected plants.

**Keywords:** *zebra chip, callose syntethas, callose acumulation, antioxidants.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (163894) otorgada para la realización de este Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, por formarme y otorgarme el grado de Doctor.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por haberme recibido en sus instalaciones como empleado y posteriormente haberme otorgado las facilidades para la realización de esta investigación.

Al laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del INIFAP, Sitio Experimental Metepec, por facilitarme el material, infraestructura y apoyo técnico para la elaboración de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Morfología y Estructura Vegetal, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por las facilidades otorgadas para realizar una parte del proyecto, correspondiente a la histología y anatomía vegetal.

Al Posgrado en Botánica que me abrió las puertas para la obtención del grado.

Al Dr. Humberto López Delgado, por su incondicional apoyo tanto personalmente, como director de la tesis y académico desde hace más de doce años, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Carlos Trejo López, por su apoyo, disponibilidad, consejos, asesoría y observaciones a este trabajo y haber fungido como mi consejero en el Posgrado.

A la Dra. Martha Elena Mora Herrera, por sus acertados comentarios para enriquecer el trabajo, por las asesorías y por sus enseñanzas a lo largo de muchos años, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Humberto Almeyda, por sus acertados comentarios y revisiones en este trabajo.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por sus asesorías, por el tiempo dedicado y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por sus acertados comentarios y por sus asesorías para enriquecer este proyecto.

Al Dr. David Espinosa Victoria, por sus acertados comentarios y cursos recibidos durante mi formación profesional.

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme esa oportunidad de vivir, crecer profesionalmente y personalmente.

A mis padres María Elena y Eduardo por alentarme siempre a superarme y conseguir mis metas planteadas, sin su apoyo y su amor no hubiese sido factible la culminación de esta etapa.

A mi novia Cynthia y su familia, que siempre estuvieron conmigo incondicionalmente a mi lado, en las buenas y en las malas, agradezco toda la ayuda emocional y física que siempre me han brindado.

A mi hermanito Daimon, por tu apoyo, aprecio y cariño.

A mis amigos incondicionales Melody, Macri, Armando, Rosy, Betza, al Club hentai (Bety, Jenny, Edith), y demás amigos a quienes aprecio y fueron parte fundamental para la culminación de este trabajo.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT .....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. JUSTIFICACIÓN .....	5
4. HIPÓTESIS .....	5
5. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
5.1. Aspectos biológicos de las Solanaceas.....	6
5.1.1. Características de <i>Solanum tuberosum</i> L.....	7
5.1.2. Enfermedades del cultivo de papa.....	8
5.2. La calosa en las plantas y su función .....	11
5.3. Aspectos biológicos de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	12
5.4. El Estrés oxidativo .....	14
5.4.1. Síntesis y función del peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	15
5.5. Síntesis y función del ácido salicílico (AS).....	19
5.5.1. El AS como mediador de la protección contra el estrés oxidativo .....	20
5.5.2. Función del AS en la defensa contra el estrés biótico .....	22
5.6. Síntesis y función del ácido ascórbico (AA).....	23
5.6.1. Función del AA en las plantas en condiciones de estrés.....	25
5.7. Efecto del AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la reducción de síntomas de SPMP .....	27
5.8. Efecto de las bacterias en las relaciones hídricas .....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
6.1. Material biológico.....	30
6.2. Etapa 1: Experimentos <i>in vitro</i> .....	30
6.3. Etapa 2 y 3: Experimentos en invernadero.....	31
6.3.1. Etapa 2: Efecto a largo plazo (pretratamientos con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	31
6.3.2. Etapa 3: Efecto a corto plazo (aspersión con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	31
6.4. Procedimientos de análisis .....	32

6.4.1. Extracción de ADN por el método CETAB.....	32
6.4.2. Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> en microplantas.....	33
6.4.3. Determinación de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33
6.4.4. Determinación de la actividad de catalasa .....	34
6.4.5. Cuantificación de la actividad enzimática de la POX.....	34
6.4.6. Contenido relativo de clorofila (SPAD meter) .....	35
6.4.7. Potencial de agua ( $\Psi_A$ ) y conductancia estomática ( $g_s$ ) .....	35
6.4.8. Parámetros de productividad.....	35
6.4.9. Análisis de microscopía para determinar deposición de calosa .....	36
6.4.10. Actividad de la calosa sintetasa por gel nativo de actividad .....	37
6.4.11. Diseño experimental.....	38
7. RESULTADOS .....	39
7.1. Etapa 1: Experimentos <i>in vitro</i> .....	39
7.1.1. Actividad POX, CAT y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	39
7.1.2. Actividad de calosa sintetasa y deposición de calosa .....	41
7.1.3. Efectos de los tratamientos de AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en vitroplantas infectadas y no infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> .....	42
7.1.4. Actividad enzimática de CAT, POX y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
7.1.5. Actividad de calosa sintetasa de plantas <i>in vitro</i> e incubadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	45
7.1.6. Peso fresco, longitud del tallo y contenido relativo de clorofila de las vitroplantas .....	47
7.2. Etapa 2 y 3: Experimentos de invernadero.....	49
7.2.1. Etapa 2: Efecto a largo plazo (pretratamientos con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	49
7.2.2. Efecto a corto plazo (aspersión con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	58
8. DISCUSIÓN.....	67
8.1. Etapa 1: Experimentos <i>in vitro</i> .....	67
8.2. Etapa 2 y 3: Experimentos de invernadero.....	72
8.2.1. Etapa 2: Efecto a largo plazo (pretratamientos con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	72
8.2.2. Etapa 3: Efecto a corto plazo (aspersión con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	81
9. CONCLUSIONES.....	86
10. LITERATURA CITADA .....	88

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1 Efecto a largo plazo del AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en algunos parámetros asociados a fotosíntesis en plantas infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> a los 73 DDT en condiciones de invernadero. Datos son de 3 experimentos n=10 ± ES. Diferentes letras denotan diferencias significativas (P≤0.05) .....	53
Cuadro 2 Efecto a corto plazo del AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en algunos parámetros asociados a fotosíntesis en plantas infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> a los 73 DDT en condiciones de invernadero. Datos son de 3 experimentos n=10 ± ES. Diferentes letras denotan diferencias significativas (P≤0.05).....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Actividad de la enzima CAT (A), POX (B) y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (C) en vitroplantas negativas y positivas a <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> a los 30 días después de subcultivarlas. Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	40
Figura 2.	Gel nativo de actividad de calosa sintetasa (A) y densidad óptica de las bandas de vitroplantas del clon 981819 negativas (carril 1-3) y positivas (carril 4-6) a <i>Ca. Liberibacter</i> . Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	41
Figura 3.	Micrografías con microscopio de fluorescencia del cuarto entrenudo de tallos de vitroplantas de 30 días de subcultivarlas tomadas a 20x. (A) plantas negativas a <i>Ca. Liberibacter</i> ; (B) plantas positivas a <i>Ca. Liberibacter</i> . x) xilema, f) floema, c) córtex.....	42
Figura 4.	Actividad de CAT (A), POX (B) y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (C) en vitroplantas positivas a <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y tratadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a los 30 días después de los tratamientos en condiciones <i>in vitro</i> . Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	44
Figura 5.	Actividad de calosa sintetasa. (A) Gel nativo de actividad, (B) densidad óptica de las bandas por tratamiento de microplantas infectadas y no infectadas, previamente tratadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , DHA. Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	45
Figura 6.	Efecto de AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , DHA en la acumulación de calosa en vitroplantas de papa cultivadas a los 30 días. Vitroplantas sanas (A), Vitroplantas infectadas (B), Infectadas tratadas con AS (C), Infectadas tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (D), Infectadas tratadas con DHA (E). Floema del Sistema vascular (f), Córtex (cx), xilema (x). Barra=200μ.....	46
Figura 7.	Peso fresco (A), altura del tallo (B) y contenido relativo de clorofila (C) en vitroplantas positivas a <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y tratadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a los 30 días después de los tratamientos en condiciones <i>in vitro</i> . Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa. ....	48

Figura 8	Actividad de POX (A), CAT (B), y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (C) en plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y pretratadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , DHA. ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	50
Figura 9	Actividad de calosa sintetasa. (A) Gel nativo de actividad, (B) densidad óptica de las bandas por tratamiento en plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y pretratadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	51
Figura 10	Efecto de AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , DHA en la acumulación de calosa en plantas sanas (A) infectadas (B) y pretratadas con AS (C), DHA (D), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (E). Floema del Sistema vascular (f), xilema (x). Barra = 80µm.....	52
Figura 11.	Peso fresco (A), y peso seco (B) de plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y pretratadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	54
Figura 12	Altura de la planta (A) y diámetro del sexto entrenudo (B) en plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y pretratadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	55
Figura 13	Número (A) y peso (B) de minitubérculos, número de brotes (C) de plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y pretratadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	57
Figura 14	Actividad de POX (A), CAT (B) y concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (C) en plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y asperjadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	59
Figura 15	Gel nativo de actividad (A), actividad de calosa sintetasa (B) densidad óptica de las bandas por tratamiento de plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y asperjadas con AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	60

Figura 16	Efecto de AS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , DHA en la acumulación de calosa en plantas sanas(A),infectadas (B), asperjadas AS 10 μM (C), DHA 6 μM (D), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1mM (E). Floema del Sistema vascular (f), xilema (x). Barra = 80μm.....	61
Figura 17	Peso fresco (A), peso seco (B) de plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y asperjadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ± ES, n=15. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	63
Figura 18	Altura del tallo (A), diámetro del sexto entrenudo (B) en plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y asperjadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	64
Figura 19	Número (A), peso (B) de minitubérculos y número de brotes por minitubérculo (C) de plantas no infectadas, infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> y asperjadas con AS, DHA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.....	66

## 1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático, ha originado que nuevas enfermedades aparezcan o las ya existentes se intensifiquen o se dispersen como por ejemplo el síndrome de `punta morada. El Síndrome de Punta Morada de la Papa (SPMP) es una enfermedad grave que afecta la producción de tubérculos en América, Europa y Australia (Maramorosch, 1998). En México los síntomas de SPMP se han asociado con el tipo de fitoplasma 16Srl y 16SrII. El fitoplasma produce la formación de tubérculos aéreos, pardeamiento interno de la pulpa, formación de muchos tubérculos pequeños y de baja calidad en cuanto al contenido de almidón y ausencia de brotes en tubérculos (Romero-Romero y López-Delgado, 2009), estos síntomas, promueven una baja calidad comercial en la papa. Recientemente también se ha asociado a la SPMP una nueva bacteria llamada *Candidatus Liberibacter sp*, al parecer este patógeno está asociado al pardeamiento interno del tubérculo conocido como “Zebra Chip” (Hansen *et al.*, 2008). Los factores bióticos y abióticos causan estrés oxidativo a través de la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO); éstas son producidas directa o indirectamente por diversas reacciones celulares y muchos compartimentos intracelulares están implicados en su generación (Scandalios, 2005). Las ERO inhiben la función enzimática, dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de la célula. Cuando las plantas están expuestas a condiciones ambientales adversas, el daño oxidativo ocurre porque el balance entre la producción de ERO y su desintoxicación por el sistema antioxidante es alterado (Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005). Existen evidencias que indican que el ácido salicílico (AS) media la respuesta a estrés ambiental en plantas, y actúa como una señal endógena que desencadena la resistencia sistémica adquirida incluso aplicado exógenamente en ausencia del estrés (Antoniw y White, 1980). Se ha

demostrado el efecto del cultivo de segmentos nodales en presencia de AS en la sobrevivencia de plántulas sometidas a termoterapia y en el número de plantas libres del virus obtenidas en dicho tratamiento (López-Delgado *et al.*, 2004). El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es una ERO que puede actuar como molécula señal y un regulador de la expresión de algunos genes en las células. Cuando se acumula en las plantas, activa factores de transcripción que regulan diferentes procesos fisiológicos como el estímulo de los mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico (Hung *et al.*, 2005). Otra molécula señal es el ascorbato (vitamina c); se ha demostrado que la forma oxidada del ascorbato (dehidroascorbato) promueve tolerancia a estrés a sal en plantas de *Cicer arietinum* (Salah, 2008) y en plantas de papa infectadas por fitoplasma (Romero-Romero y López Delgado, 2009); así mismo ha sido implicado en la señalización de la expresión génica contra el estrés biótico y abiótico (Foyer y Noctor 2005). Hay limitada información sobre la aparición de síntomas de infección por *Ca. Liberibacter solanacearum* así como su interacción con el estrés abiótico; al parecer, el estrés ambiental podría ser un factor determinante en la manifestación de los síntomas en plantas aparentemente sanas, por lo que el conocimiento de las respuesta fisiológicas en la planta mediadas por moléculas señal es importante para dar mejores alternativas del manejo integrado del cultivo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Estudiar el efecto del peróxido de hidrógeno, ácido salicílico y dehidroascorbato como moléculas señalizadoras, en la respuesta al estrés oxidativo y relaciones hídricas en plantas de *Solanum tuberosum* infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

### **2.2. Objetivos específicos**

#### **Etapas 1 y 2 Condiciones *in vitro***

Determinar si existen cambios en los sistemas antioxidativo (actividad enzimática de la catalasa y la peroxidasa) y oxidativo (concentración de peróxido de hidrógeno) entre plantas infectadas y no infectadas por *Candidatus Liberibacter solanacearum* en condiciones *in vitro*.

Estudiar el efecto de los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los sistemas antioxidativo (actividad enzimática de la catalasa y la peroxidasa), oxidativo (concentración de peróxido de hidrógeno) y la acumulación de calosa en tejido vascular mediante técnicas histológicas en plantas infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

#### **Etapas 3 y 4 Condiciones de invernadero**

Evaluar el efecto de los tratamientos con DHA, SA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a largo y corto plazo, en la reducción de síntomas de punta morada asociados a *Ca. Liberibacter solanacearum* en invernadero y su relación con la actividad enzimática de catalasa y peroxidasa, así como, la concentración de peróxido de hidrógeno.

Estudiar el efecto del DHA, SA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la acumulación de calosa en tejido vascular mediante técnicas histológicas, así como la actividad enzimática de calosa sintetasa en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum*.

Determinar el potencial de DHA, SA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reducción de daños al tubérculo (pardeamiento de la pulpa y brotación) y el rendimiento en plantas de papa infectadas con *Ca. Liberibacter* para tubérculos no destinados a semilla.

Evaluar el efecto de DHA, SA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en parámetros fisiológicos como potencial hídrico, conductancia estomática y contenido de clorofila en plantas de papa infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las enzimas antioxidantes como catalasa, POX y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, están asociados a la atenuación de síntomas por la infección de fitoplasma en plantas de *Solanum tuberosum*, efecto que es regulado por tratamientos con AS, DHA o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Romero-Romero y López-Delgado, 2009; Sanchez-Rojo *et al.*, 2011, Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012), lo anterior justifica el estudio de la fisiología del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reducción de síntomas por *Ca. Liberibacter* así como la relación entre la acumulación de calosa y las enzimas calosa sintasa, CAT, POX y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediada por dichas moléculas sin importar el agente causal.

### 4. HIPÓTESIS

La infección de *Ca. Liberibacter* que produce la enfermedad de “Zebra chip” resulta en estrés oxidativo y en una reducción en el flujo del floema debido a un incremento en la síntesis de calosa, la atenuación de síntomas por AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estará asociada a una reducción de la acumulación de calosa en tubos cribosos mediada por el sistema antioxidante.

## 5. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1. Aspectos biológicos de las Solanaceas

La familia Solanaceae comprende 96 géneros y alrededor de 2,300 especies (D'Arcy 1991). Es de distribución cosmopolita; se encuentra con mayor frecuencia en regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas; en un intervalo altitudinal de 0 a 3 000 m. Solanaceae incluye especies de gran importancia económica: alimenticia, como la papa, *Solanum tuberosum* L.; jitomate, *Solanum esculentum* L.; berenjena, *Solanum melongena* L.; chile, *Capsicum* spp.; y tomate de hoja, *Physalis* spp.; otras de uso industrial como el tabaco, *Nicotiana tabacum* L.; Las características principales de la familia Solanaceae, son las de ser plantas generalmente herbáceas, aunque hay especies arbustivas y arbóreas, generalmente susceptibles a daño por heladas y a daño por enfriamiento. Las hojas son alternadas y las flores pentámeras perfectas, cuyos pétalos forman una corola tubular, al menos en la base, y los estambres se alternan con los cinco lóbulos de la corona. El ovario generalmente es bilocular, aunque también puede ser multilocular, con muchos óvulos en placentas axilares, y con un estilo terminal. Los frutos pueden ser bayas o cápsulas. En varias especies existe una reconocida producción de alcaloides o compuestos nitrogenados aromáticos (atropina, nicotina, solanina, tomatina, etc.) los que, en algunos casos, se usan como drogas medicinales o estimulantes pero fácilmente pueden llegar a ser tóxicos para los animales y el hombre. Esto hace que las solanáceas, en general, hayan sido consideradas como especies venenosas y motivo de desconfianza por muchos años (Vargas *et al.*, 2003).

### **5.1.1. Características de *Solanum tuberosum* L**

*Solanum tuberosum* se caracteriza por presentar un tallo aéreo que puede ser ramificado, es generalmente hueco y triangular en sección transversal; tiene protuberancias rectas u onduladas, la parte basal es redonda y sólida. El tallo se considera principal si crece directamente del tubérculo y a las ramas laterales de éste se les denomina tallo secundario. La formación del estolón y del tubérculo es similar a la del tallo principal. El tallo puede desarrollar ramas apicales durante su crecimiento (Rubio *et al.*, 2000). Las hojas son compuestas, formadas por un peciolo con foliolo terminal, foliolos laterales secundarios y a veces terciarios intersticiales. La nervadura de las hojas es del tipo reticulado y tienen generalmente una sola yema axilar latente (Rubio *et al.*, 2000). Las flores están agrupadas en una inflorescencia cimosa, situada siempre en la extremidad de un tallo. La flor es actinomorfa y pentámera la cual es sostenida por un pedicelo (Rousselle y Crosnier, 1999). Son de colores diversos, tienen estilo y estigma simples y ovario supero bilocular. Las plantas que provienen de semilla sexual desarrollan raíces delgadas de donde salen las radículas laterales. Las plantas que crecen directamente del tubérculo desarrollan raíces adventicias en los nudos del tallo y un sistema radical a una profundidad de 40 a 50 cm (Rubio *et al.*, 2000). El tubérculo es un engrosamiento del estolón. Se puede considerar como una parte del tallo adaptado para el almacenamiento de reservas alimenticias y de reproducción. La distancia entre la cutícula y el anillo vascular es normalmente de 0.5 cm, pero estos están más o menos unidos cerca de los ojos donde se conecta el estolón. El brote es el inicio de un tallo y se forma en los ojos del tubérculo a partir de una yema. En un ojo puede haber tres o más yemas en las cuales se distinguen una serie de partes como: primordios foliares enclaustrados, radículas, estolones, lenticelas y tricomas. Las

estructuras mencionadas anteriormente y la forma y color del brote son características genéticas que se emplean para identificar el clon o una variedad (Rubio *et al.*, 2000).

### **5.1.2. Enfermedades del cultivo de papa**

El cambio climático global ha promovido la aparición y diseminación de patógenos que merman ampliamente la producción de muchos cultivos de importancia económica; también ha promovido sequías, las cuales aumentan el daño al rendimiento y producción agrícola. En México, como en muchos países, el cultivo de la papa es de importancia económica y alimenticia. Este cultivo es afectado por enfermedades causadas por diferentes patógenos y por factores ambientales que reducen la producción agronómica y el manejo de germoplasma en general. Actualmente, la producción de papa es altamente dependiente de insumos y pesticidas sintéticos para contrarrestar el ataque de plagas y patógenos. El cultivo se ve amenazado por diversos patógenos, entre las principales plagas que lo atacan se encuentran las siguientes: nematodos (*Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne* sp. y *Ditilenchus destructor*), gallina ciega (*Phyllophaga* spp.), gusano de alambre (*Agriotes* spp.), grillo (*Grillus assimillis*), mosquita blanca (*Trialeuroides vaporariorum*), pulgones (*Myzus persicae* S. y *Macrosyphum euphorbiae* T.) y psílido de la papa (*Paratrioza cockerelli*); entre las enfermedades ocasionadas por estos y otros agentes se encuentran: la costra negra (*Rhizoctonia solani* K.), roña polvorienta (*Spongospora subterranea*), manchón foliar (*Cescospora* spp. pierna negra (*Erwinia* spp.), marchitez temprana (*Pseudomonas solanacearum*), pudrición seca (*Fusarium* spp.), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), punta morada, virus del enrollamiento de la papa, mosaico rugoso y mosaico latente (Rubio *et al.*, 2000).

### **5.1.2.1. Síndrome de la Punta Morada de la papa (SPMP)**

El síndrome llamado "Punta Morada" de la Papa" (SPMP), una de las principales enfermedades de la papa, es asociada con la incidencia de un Fitoplasma, o una bacteria como *Candidatus Liberibacter solanacearum*, transmitidos por *Bactericera cockerelli* (Sulc, chicharritas) que se presenta en las principales zonas paperas de México y es una seria amenaza a la producción nacional de este cultivo; afectándose el rendimiento de un 30% al 95% y la calidad comercial de la semilla-tubérculo (Cadena *et al.*, 2003). Los principales síntomas son: enrollamiento apical, entrenudos cortos, coloración purpúrea en los foliolos, clorosis, proliferación de brotes axilares engrosados en la base, formación de tubérculos aéreos, pardeamiento del tubérculo y brotación nula o en forma de hilo (Cadena, 1993; Lee, *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha demostrado cual es la causa exacta de esta enfermedad, inclusive en este síndrome también se ha implicado a otros patógenos como *Xillela fastidiosa* o *Candidatus Liberibacter solanacearum* como patógenos asociados a la enfermedad (Hansen *et al.*, 2008).

### **5.1.2 .2. Enfermedad de "Zebra" chip en la papa**

"Zebra chip" (ZC) en papa es reportado desde 1994 en México (Secor y Rivera-Varas, 2004). Hasta ahora, se desconoce exactamente como es la transmisión de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Estudios realizados sugieren que el psílido del tomate y de la papa *Bactericera cockerelli* es el vector de la bacteria y promueve la "zebra chip" en papa, en otras especies y familias de plantas; sin embargo, este insecto tiene una preferencia por las especies de la familia solanceae (Munyanzeza *et al.*, 2007). La transmisión exitosa de patógenos hacia las plantas depende de la eficiencia de

inoculación del vector y de la rapidez con que el insecto transmita al patógeno a la planta huésped. Un ejemplo, es el psílido de la papa *Bactericera cockerelli* (Sulc), que en estudios previos y recientes se ha determinado como el transmisor de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*,” una enfermedad que origina miles de millones en pérdidas económicas alrededor del mundo (Munyaneza *et al.*, 2012).

Poco se conoce sobre la epidemiología del ZC y las capacidades de inoculación del vector. Hasta ahora, estudios preliminares se basan en las capacidades de infección de las ninfas e insectos en edad adulta en condiciones controladas. En estos estudios, se pretendió establecer la eficiencia de trasmisión del patógeno y si éste es el responsable de los síntomas de ZC, la severidad del daño y la reducción de la productividad (Buchman *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que los psílidos en etapas adultas son vectores altamente eficientes promoviendo ZC y que las ninfas son menos eficientes que los adultos en transmitir la bacteria. También se ha determinado, que el periodo de inoculación tiene poca influencia en la incidencia de ZC, la severidad y en la pérdida de productividad. Estudios previos, demostraron que un insecto portador de la bacteria puede en 6 horas infectar la planta y mostrar los primeros síntomas de ZC; pero, aún no se han establecido medidas adecuadas de control de esta enfermedad, siendo la eliminación del vector la única alternativa viable para evitar la incidencia de ZC (Munyaneza *et al.*, 2012).

El psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc) es nativo del suroeste de Estados Unidos y del Norte de México (Wallis, 1955). El psílido, responde a los cambios de temperatura en el ambiente. Cuando se incrementa la temperatura en primavera, el insecto migra hacia ciertas regiones más templadas principalmente Canadá y Estados Unidos.

Históricamente el insecto está asociado con otra enfermedad conocida como “El amarillamiento del psílido” en Solanaceas, que es caracterizada principalmente por clorosis en las hojas, aparición de una coloración purpurea, achaparramiento, entrenudos cortos y en caso de la papa promueve la tuberización aérea, reduciendo la producción de cualquier cultivo que este asociado con este patógeno. La enfermedad del amarillamiento del psílido podría estar asociada con una toxina, que probablemente es inyectada cuando el insecto se alimenta de la planta y por la presencia de *Candidatus Liberibacter* (Munyaneza *et al.*, 2012). No obstante, aún no está bien identificado si es un síndrome o bien el agente causal es la toxina o el patógeno *per se*.

Otro de los síntomas por *Candidatus fitoplasma* y *Candidatus Liberibacter* es el engrosamiento del tallo que podría estar asociado con un taponamiento de los tubos cribosos (Christensen *et al.*, 2005), este bloqueo puede ser por un gran acumulo de calosa promovido por la infección de la bacteria.

## **5.2. La calosa en las plantas y su función**

La calosa es un polisacárido en forma de  $\beta$ -1,3-glucano con ramificaciones  $\beta$ -1,6 que se encuentra en la pared celular en una amplia variedad de plantas. La calosa tiene un papel importante en el desarrollo de la planta pero sobre todo en respuesta a múltiples tipos de estrés tanto bióticos como abióticos. Se ha observado que la deposición de calosa ocurre a pocos minutos del daño mecánico, químico, incremento o disminución de temperatura y finalmente en un ataque microbiano (Stone *et al.*, 1992). Se han reportado que la expresión de los genes *GSL5/PMR4/CalS12* son responsables de la síntesis de calosa en respuesta al daño mecánico o por patógeno. La pérdida de

la función de alguno de los genes *GSL5/PMR4/CalS12* haga más resistente a la planta en vez de hacerla susceptible al ataque patogénico. La posible explicación es que la calosa podría impedir que la maquinaria de defensa de la planta se active contra el patógeno; por lo tanto la remoción de calosa en el mutante *gs/5* podría activar la defensa contra éste (Jacobs *et al.*, 2003). La calosa inducida por patógenos podría estar regulando los mecanismos de señalización del AS; se ha demostrado en el mutante *pmr4* de *Arabidopsis* que codifica para la síntesis de calosa, incrementó la señal del AS reduciendo la acumulación de calosa, resultando en mayor resistencia al patógeno (Jacobs *et al.*, 2003).

### **5.3. Aspectos biológicos de *Candidatus Liberibacter solanacearum***

El género *Candidatus Liberobacter* fue propuesto por primera vez por Jagoueix *et al.* (1994) con dos miembros: *Candidatus Liberobacter asiaticus* y *Candidatus Liberobacter africanum*; posteriormente fue renombrado *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Candidatus Liberibacter africanus* de acuerdo con la reglas del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias. En el año 2004, una tercera especie fue descrita por Teixeira y colaboradores en Brasil nombrándose *Candidatus Liberibacter americanus*. Estas especies de bacterias, generalmente afectan cítricos y otras Rutaceas, con la enfermedad conocida como “huanglongbing” (Bové, 2006).

Se han realizado estudios a nivel de microscopia electrónica por Tanaka *et al.* (2007), los cuales muestran la forma alargada de este tipo de bacterias. Las especies de *Candidatus Liberibacter* pertenecen a las Alfabroteobacterias, estrechamente asociadas con el género de *Bradyrhizobium*, *Bartonella*, *Agrobacterium*, *Brucella* y *Afiplia* (Jagoueix *et al.*, 1994). Se consideraba, que una enfermedad presente en

*Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* estaba asociada con alguna de las especies de *Candidatus* antes mencionadas o bien por un hongo. Posteriormente Liefting *et al.* (2009), realizó un estudio mediante microscopía electrónica, determinando que era una bacteria asociada al floema y no algún otro microorganismo patógeno. Posteriormente, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se usaron iniciadores (“primers”) específicos universales 16S rRNA con diferentes combinaciones de ADN de plantas enfermas y de plantas sanas como testigos. Las secuencias de los productos, revelaron que el patógeno compartía una alta similitud con las secuencias de las especies de *Candidatus* Liberibacter. Posteriormente el resto del gen 16S rRNA fue secuenciado y analizado filogenéticamente mostrando que era diferente a las tres especies descritas anteriormente. Posteriormente, con el desarrollo de un método específico, mediante PCR también fue detectado el patógeno en papa (*Solanum tuberosum*), tamarillo (*Solanum betaceum*), grosella (*Physalis peruviana*) y chile (*Capsicum* sp.) (Liefting *et al.*, 2008).

Después de hacer un análisis filogenético, basado en la secuencia del gen 16S rRNA y de aproximadamente 580 pb del operón  $\beta$  incluyendo parcialmente a los genes *rplJ* y *rplL* del genoma de los organismos detectados en Chile, papa, tamarillo y grosella; se encontró, que todas las secuencias eran idénticas a las de la secuencia NZ082226 del organismo aislado de tomate. Con estos resultados se sugirió que se nombraran a los organismos de acuerdo con la familia de plantas hospedadoras, más que por la región geográfica de su primer reporte. El primer reporte de *Candidatus* Liberibacter solanacearum fue identificado en Nueva Zelanda y posteriormente se ha identificado como una enfermedad en Estados Unidos conocida como “Zebra Chip” en plantas de papa (Abad *et al.*, 2009).

Los factores ambientales y las enfermedades asociadas a patógenos como *Ca. Liberibacter solanacearum* causan estrés oxidativo a través de la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas son destructivas a todos los componentes celulares, aunque también tienen una función importante como señales en la regulación de la expresión genética, así, las plantas responden a condiciones ambientales adversas y al ataque de organismos patógenos (Dat *et al.*, 2000; Foyer y Noctor, 2005) lo que puede llevar a la aclimatación y/o tolerancia cruzada en las plantas (Bhattacharjee, 2005).

#### **5.4. El Estrés oxidativo**

Los factores bióticos y abióticos causan estrés oxidativo a través de la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como: oxígeno en estado singulete ( $^1\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Scandalios, 2005). El estrés aumenta el estado de oxidación de la célula, lo cual induce un incremento en la síntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para contrarrestar los efectos de dicha oxidación. Los principales antioxidantes enzimáticos son: peroxidasas (POX), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S-transferasa. Los antioxidantes no enzimáticos más importantes son: ácido ascórbico (AA, vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión y  $\beta$ -carotenos y fenoles (Scandalios, 2005). Se ha encontrado que algunos compuestos relacionados con las respuestas oxidativas y antioxidativas originadas por factores de estrés, como el AA, ácido salicílico (AS),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entre otros, están involucrados en las respuestas de tolerancia a estrés biótico y abiótico así como el desarrollo óptimo de las plantas (Mora-Herrera *et al.*, 2005).

#### 5.4.1. Síntesis y función del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el producto de uno de los pasos en la reducción molecular del oxígeno (el primer paso conduce al radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y tienen una vida media relativamente más larga en comparación con otras moléculas ERO. La vida media (1 ms) y su tamaño pequeño le permite difundirse a través de la membrana celular y migrar a diferentes compartimentos, estas características, facilitan las funciones de señalizador. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es regulador de una multitud de procesos fisiológicos como la resistencia adquirida, reforzamiento de la pared celular, producción de fitoalexinas, en la fotosíntesis, apertura estomática, el ciclo celular y en casos extremos inducción de muerte celular programada (Petrov y Breusegem, 2012).

La producción activa del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocurre principalmente en el apoplasto de la célula y es requerido para activar el estallido oxidativo, como parte de la respuesta hipersensitiva en respuesta a la infección de un patógeno, siendo un prerrequisito para el crecimiento, desarrollo y muerte celular (Miller *et al.*, 2010).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un bioproducto del metabolismo aeróbico en las plantas, puede ser sintetizado tanto enzimáticamente como no enzimáticamente. Hay diferentes rutas de producción en las células, como en la fotorespiración y cadena transportadora de electrones. Existe evidencia de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas a través de varios mecanismos enzimáticos como las peroxidasas de la pared celular, amino oxidasas entre otras. La nicotinamida adenina dinucleotido fosfatasa (NADPH) puede incrementar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la generación de superóxido, el cual puede ser convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por una dismutación de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Remans *et al.* (2010) observaron que la acumulación de EROs, especialmente la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta asociada principalmente con la estimulación de la actividad de

NADPH oxidasa en plantas bajo condiciones de estrés por metales pesados. La producción de  $H_2O_2$  mediante la NADPH oxidasa puede incrementar la acumulación de prolina en *A. thaliana* en condiciones de estrés por sal o manitol (Niu y Liao, 2016).

Varias reacciones no enzimáticas son conocidas en la generación de  $H_2O_2$ . Por ejemplo muchas reacciones están involucradas en la fotosíntesis y en la respiración. El  $H_2O_2$  es generado continuamente en la cadena transportadora de electrones tanto en la mitocondria como en cloroplasto (Niu y Liao, 2016).

Los peroxisomas son el sitio donde se lleva a cabo la fotorespiración en las células vegetales, los cuales son dependientes de la luz para tomar el  $O_2$  y liberar  $CO_2$  acompañado con la generación de  $H_2O_2$ . Se sugiere que la síntesis de peróxido está asociado con la oxidación del glicolato en el ciclo de la oxidación del carbono durante la fotosíntesis (Foyer y Noctor, 2003).

Los cloroplastos son la fuente de síntesis de  $H_2O_2$  de las plantas. Los cloroplastos son sitios importantes de generación de  $H_2O_2$  durante la fotosíntesis. El  $H_2O_2$  generado está asociado con la reducción del oxígeno en el cloroplasto. Mehler (1951) descubrió que la reducción del  $O_2$  conduce a la producción de  $H_2O_2$  en presencia de luz en el cloroplasto. Por otro lado, la producción del  $H_2O_2$  puede ser por la reducción de  $O_2^-$  por el transporte electrónico en la fotosíntesis (PET) tales como los centros Fe-S, teoredoxina reducida, ferredoxina y plastoquinona reducida (Dar *et al.*, 2000).

En la mitocondria el  $H_2O_2$  se genera durante la respiración aerobia, cuando el  $O_2^-$  se produce en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, el cual es rápidamente transformado a  $H_2O_2$  vía enzima SOD (Niu y Liao, 2016).

#### **5.4.1.1. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula señal en las plantas durante diferentes tipos de estrés**

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se ha mencionado, tiene una vida larga en comparación con otras ERO, es una molécula relativamente pequeña, lo cual le permite difundirse a través de las de las membranas a diferentes compartimientos. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede mover a través de las células mediante canales de acuaporinas y promover traducción de señales (García-Mata y Lamattina, 2013). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede regular diferentes procesos fisiológicos como por ejemplo como molécula señalizadora durante el estrés nitrosativo (excesiva formación de óxido nítrico) activando la muerte celular en *Brassicarapa* var. *glabra* Regel (Kim *et al.*, 2015). Li *et al.* (2015) sugieren que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado en un señalamiento cruzado entre el óxido nítrico (NO) y sulfito de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) para inducir termotolerancia en plántulas de maíz. También se ha demostrado el efecto que tiene el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la síntesis de brasinoesteroides y su participación en el cierre estomático regulando el movimiento de iones de las células oclusivas (Shi *et al.*, 2015). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interactúa con otras moléculas en la señalización como lo son las hormonas (Shi *et al.*, 2015), proteínas cinasas (González *et al.*, 2012). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede influenciar otros mecanismos de señalización promoviendo procesos fisiológicos como la co-regulación de la división celular y la diferenciación, el sistema antioxidante, así como la expresión involucrada en la defensa y desarrollo de las plantas (Shi *et al.*, 2015).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula señal, la cual está asociada con diferentes mecanismos de respuesta al estrés biótico y abiótico. Estudios previos demostraron un incremento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de sequía observándose un incremento en la actividad de SOD, POD y CAT, fenoles totales, ácido ascórbico y reducción de azúcares totales, y clorofila (Ashraf *et al.*, 2015).

El  $H_2O_2$  ha demostrado efectos positivos contra el estrés abiótico mediando la regulación de enzimas antioxidantes como ocurre en el estrés por sal (Larkindale y Huang, 2004), estrés por calor (Gao *et al.*, 2010), así como por estrés hídrico (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012) sugiriendo que el  $H_2O_2$  incrementa el sistema antioxidante, siendo el primer mecanismo de protección contra el estrés ambiental (Bian y Jian, 2009). La acumulación de  $H_2O_2$  podría ser un factor endógeno que impide la diseminación y replicación de patógenos en las hojas, inhibiendo al patógeno o bien mediante la generación de ERO, moléculas que podrían tener un efecto antimicrobiano como ha sido demostrado en el dosel de árboles de manzana infectados por fitoplasma (Musetti *et al.*, 2004).

#### **5.4.1.2. Removedores enzimáticos y no enzimáticos celulares del $H_2O_2$**

El sistema antioxidante que regula la concentración de  $H_2O_2$  es enzimático y no enzimático. La vía enzimática incluyen a la CAT, POX, APX y glutatión reductasa (GR). Algunos estudios han revelado que APX se ha encontrado en el citosol (Begara-Morales *et al.*, 2013), cloroplastos y mitocondria (Navrot *et al.*, 2007). La CAT, puede descomponer directamente el  $H_2O_2$  en el peroxisoma y transformarlo en  $H_2O$  y  $O_2$  sin necesidad de algún intermediario o utilización de un cofactor como sustrato, debido a que la CAT utiliza al  $H_2O_2$  directamente como el sustrato (Nyathi y Baker, 2006). Es claro que estas enzimas existen en diferentes organelos y pueden disminuir concentración de  $H_2O_2$  eficientemente y mantener la estabilidad de las membranas (Niu y Liao, 2016).

El ascorbato (AA) y el glutatión (GSH), son compuestos no enzimáticos, están constantemente participando en la regulación de las ERO. El AA es un antioxidante clave para la eliminación de  $H_2O_2$ , puede reaccionar directamente con el  $H_2O_2$ . El GSH es un antioxidante crucial el cual puede estar asociado con la regeneración del AA oxidando rápidamente los excesos de  $H_2O_2$ ; de hecho el GSH está involucrado en la regulación de la concentración  $H_2O_2$  y el balance redox en las células mediante el ciclo glutatión-ascorbato (Krifka *et al.*, 2012). La homeóstasis del  $H_2O_2$  resulta en mecanismo de señalización en la traducción de señales (Niu y Liao, 2016).

### **5.5. Síntesis y función del ácido salicílico (AS)**

El ácido salicílico es otro compuesto que se sintetiza durante algún tipo de estrés biótico o abiótico como lo es el  $H_2O_2$ , cuya función como molécula señal y reguladora de procesos fisiológicos, bioquímicos y estructurales es conocida. El AS es un compuesto fenólico, que a pesar de su amplia distribución en la planta, llega a presentar concentraciones basales entre especies; por ejemplo en la familia de las solanáceas como *N. tabacum* contiene un nivel basal muy bajo de AS [ $<100 \text{ ng g}^{-1}$  de peso fresco] en hojas, mientras que en *Solanum tuberosum* podría contener unos  $10 \mu\text{g}$  de AS por  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco (Navarre y Mayo, 2004). El AS es sintetizado mediante dos vías de compartimentalización empleando diferentes precursores. La ruta fenil propanoides en el citoplasma, inicia de la fenilalanina y la vía del isocorismato que se desarrolla en el cloroplasto. Mucho del AS sintetizado es glucosilado y/o metilado; las reacciones de conjugación son catalizadas por la AS-glucosiltransferasa citosólica que es inducida por la aplicación exógena de AS o por el ataque de un patógeno (Song, 2006). Interesantemente, el AS es también convertido a metil salicilato (MeSA) por un AS-

carboxil metiltransferasa, este compuesto es volátil y se ha demostrado que es una molécula señal de gran disipación en *Arabidopsis* que media la resistencia sistémica adquirida (Vlot *et al.*, 2009).

El AS es una molécula señal que participa como mediadora, regulando diferentes respuestas al estrés abiótico, como sequía, frío, heladas, tolerancia a metales pesados, etc. y abiótico, resistencia a bacterias, virus y hongos (Rivas-San Vicente y Plascencia, 2011). El AS, regula muchos de los procesos de crecimiento y de desarrollo en las plantas. Existen evidencias que esta hormona regula procesos tales como la germinación de semillas, crecimiento vegetativo, fotosíntesis, respiración, formación de flores, producción de semillas, senescencia, termogénesis y un tipo de muerte celular programada que no está asociada con la respuesta hipersensitiva (Rivas-San Vicente y Plascencia, 2011). El AS, también contribuye a mantener la homeostasis celular mediante la regulación de enzimas antioxidantes y la regulación de la expresión génica (Xie *et al.*, 2001).

#### **5.5.1. El AS como mediador de la protección contra el estrés oxidativo**

El AS promueve tolerancia al estrés abiótico cuando es asperjado exógenamente. Estudios en plántulas de cebada y maíz asperjadas con AS demostraron que esta molécula señal, promovió tolerancia al paraquat (Pq) y cadmio respectivamente (Ananieva *et al.*, 2002; Krantev *et al.*, 2008). El Pq es un herbicida no selectivo que acepta electrones del fotosistema I y los transfiere al oxígeno molecular. Esta reacción resulta en la acumulación de EROs que causa un gran daño, como la peroxidación de lípidos, ruptura clorofílica, pérdida en la actividad fotosintética, pérdida de la integridad de la membrana, y pérdida de electrolitos (Ananieva *et al.*, 2002).

El AS, mejora la germinación en condiciones de estrés abiótico. En bajas dosis de aplicación exógena, el AS incrementó significativamente la germinación y el establecimiento de la plántula en *Arabidopsis* en diferentes condiciones de estrés (Rajjou *et al.*, 2006; Alonso-Ramírez *et al.*, 2009). En condiciones de estrés por sal, las semillas sin AS germinaron solo el 50% de las semillas, sin embargo, en presencia de AS se incrementó hasta en un 80% de germinación. Aplicaciones de AS parcialmente revirtió el efecto inhibitorio del efecto oxidativo del golpe de calor (50 °C) en la germinación (Alonso-Ramírez *et al.*, 2009).

El AS es un importante regulador de la fotosíntesis, participa en la formación de la hoja y estructura del cloroplasto (Uzunova y Popova, 2000); así como en la apertura y cierre del estoma en participación con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, síntesis de clorofila y de carotenoides (Fariduddin *et al.*, 2003) y la actividad de enzimas importantes como la RuBisCO (Slaymaker *et al.*, 2002); sin embargo, altas dosis de AS causa una reducción de la fotosíntesis (PN) y actividad de RuBisCO en plantas de cebada. El decline de la actividad de RuBisCO fue atribuida a una reducción del contenido de proteína soluble (Slaymaker *et al.*, 2002). Aplicaciones exógenas de AS inducen alteraciones en la anatómica foliar que consisten en una reducción del grosor de la epidermis abaxial y adaxial y tejido del mesófilo; tales cambios, se correlacionaron ultra estructuralmente con un incremento en el volumen de los cloroplastos, de los granas tilacoides y coagulación del estroma (Uzunova y Popova, 2000).

Los salicilatos también han mostrado incrementar la tolerancia a bajas temperaturas; recientemente en plántulas jóvenes de maíz la aplicación exógena de AS y ácido acetil salicílico (AAS) incrementaron la protección a estrés por baja temperatura (Janda *et al.*, 2003). Así mismo, Senaratna *et al.* (2000), encontraron que estos mismos

compuestos incrementaron la tolerancia a estrés por calor, frío y sequía en plantas de tomate y frijol, por la función de estas moléculas en la señalización para inducir tolerancia y resistencia, más que un efecto directo. Se tienen evidencias que la inducción de tolerancia a diferentes tipos de estrés inducida por AS, ABA, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está asociada al estrés oxidativo y a la respuesta antioxidante, (Zhou *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2007; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012). Inclusive, la aclimatación a frío está asociada al incremento de enzimas antioxidantes y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se reportó en la aclimatación a frío de plantas de maíz (Kingston-Smith *et al.*, 1999). En papa, el AS indujo termotolerancia para eliminar el virus X, incremento la supervivencia un 40% en microplantas tratadas con AS con respecto a las no tratadas. El AS también mejoró la supervivencia en el subcultivo posterior a la termoterapia, e incremento el número de plantas libres de virus a un 100% comparado con 40 a 65% en los testigos (López-Delgado *et al.*, 2004).

### **5.5.2. Función del AS en la defensa contra el estrés biótico**

Las plantas tienen mecanismos de protección contra una gran diversidad de organismos herbívoros, así como de microorganismos patógenos, mediante una expresión de mecanismos constitutivos y defensas inducidas haciendo a la planta una fuente limitante de comida para el depredador.

Los primeros tres mecanismos de defensa que han sido bien estudiados durante el ataque de un patógeno o herbívoro son los mecanismos de señalización regulados por el ácido jasmónico (JA), el ácido Salicílico (AS) y el Etileno (ET) (Glazebrook, 2005; Walling, 2009). Los herbívoros y microorganismos patógenos introducen un distintivo grupo de elicitores y efectores que son percibidos por las plantas hospederas. Estas

señales les permiten a las plantas mediar un mecanismo específico para cada uno de los patógenos (Walling, 2009).

El AS regula los mecanismos de defensa y son activados por organismos biotróficos (patógenos que se alimentan de las células vivas que invaden) y muchos organismos que se alimentan vía floema. Frecuentemente el AS induce señales antagonicas con el JA y el ET regulando sus mecanismos de señalización. La supresión del JA y ET confiere susceptibilidad a muchos organismos que son dañinos a las plantas de forma que puede influenciar la atracción de enemigos naturales de los herbívoros (Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos de defensa contra los endosimbiontes como *Candidatus Liberibacter*. Al parecer los endosimbiontes pueden evadir el sistema de reconocimiento de las plantas, comprometiendo los mecanismos de defensa.

## **5.6. Síntesis y función del ácido ascórbico (AA)**

La vitamina C (ácido ascórbico) es un antioxidante y un sustrato clave para la detoxificación de diferentes ERO. El citoplasma celular constituye el mayor pool de ascorbato, transportándose cerca de un 5% a través de la membrana hacia el apoplasto, la fracción apoplastica es determinante como molécula señalizadora ante un estrés (Foyer y Noctor, 2011).

La biosíntesis del ácido ascórbico (AA) en plantas superiores toma lugar en la mitocondria mediante diferentes rutas. La ruta Smirnoff-Wheeler es la más estudiada (Wheeler *et al.*, 1998) o también llamada ruta metabólica de la D-mannosa/L-galactosa. Durante esta ruta la D-glucosa es convertida a D-glucosa-6-fosfato por la enzima hexoquinasa. La D-glucosa-6-fosfato es convertida a GDP-D-manosa vía cuatro pasos

reversibles catalizados por las enzimas fosfogluco-isomerasa, manosa 6-fosfato, isomerasa, fosfomanosa mutasa y GDP-D-manosa fosforilasa. La segunda fase mayor, involucra la conversión de GDP-D-manosa formada previamente en la GDP-L-galactosa durante tres reacciones catalizadas sucesivamente por la GDP-D-manosa 3',5'-epimerasa, GDP-L-galactosa fosforilasa y L-galactosa 1-P fosfatasa. La GDP-L-galactosa es subsecuentemente convertida a L-galactosa por la reacción de la enzima L-galactosa deshidrogenasa y finalmente a L-galactano-1,4-lactano (precursor final del AA). Finalmente el AA es formado del L-galactano-1,4-lactano mediante una reacción enzimática llevada a cabo por la L-galactano-1,4-lactano deshidrogenasa. La segunda ruta en la síntesis del AA involucra a las pectinas de la pared celular, la degradación resulta en la formación de un compuesto llamado metil-galacturonato, el cual es convertido a L-galactonato, finalmente es convertido por la enzima aldano-lacnasa a L-galactano-1,4-lactano que posteriormente es usado para sintetizar AA (Smirnoff *et al.*, 2001).

Debido a la naturaleza regenerativa del AA es una de las moléculas con mayor influencia fisiológica en las plantas, el cual puede interactuar con otros compuestos como la vitamina E para reducir la concentración de ERO mediante catálisis enzimática (Noctor y Foyer, 1998). El ciclo ascorbato-glutation está involucrado con procesos de desarrollo de las plantas, el cual permite controlar el metabolismo oxidativo (Pignocchi y Foyer, 2003).

El AA se oxida en muchas de sus funciones, produciendo el radical monodehidroascorbato, el cual puede ser reducido por la monodehidroascorbato reductasa o experimentar una dismutación para generar dehidroascorbato (DHA), que se puede reducir a AA por la glutatión reductasa (Gillespie y Ainsworth 2007). Los

cambios de concentración de AA puede modular la expresión génica de proteínas de respuesta a patogénesis (PRP), expresión génica y resistencia sistemática adquirida, actuando como una molécula señal de transducción (Pastori *et al.*, 2003). En un análisis de microarreglos en el mutante de *Arabidopsis vtc1* (carente de vitamina C) y el correspondiente tipo silvestre *Col-0*, un total de 171 transcriptos fueron modificados, codificando proteínas implicadas en control del ciclo celular, la señalización y los procesos de desarrollo, la pared celular, el metabolismo de los lípidos y la síntesis antocianinas. Los cambios más notables de transcripción se observaron para genes implicados en las respuestas al estrés biótico, en particular las transcripciones de las proteínas PRP, la translocación y síntesis de proteínas (Pastori *et al.*, 2003). Por otra parte, AA también es un regulador de la división celular, elongación celular y el crecimiento (Kerk y Feldman 1995).

#### **5.6.1. Función del AA en las plantas en condiciones de estrés**

El AA protege tanto a los organelos como a las células de los daños ocasionados por sobreacumulación de las ERO, promovidas por algún tipo de estrés (Naz *et al.*, 2016). El AA controla la división y expansión celular, actúa como cofactor de muchas enzimas, modula la percepción de señales, participa en la fotosíntesis, en la biosíntesis de reguladores de crecimiento y regeneración de antioxidantes. El AA es abundante en los meristemas, células fotosintéticas y diferentes frutos (Mazid *et al.*, 2011). Altas concentraciones de AA se han encontrado en cloroplastos de hojas completamente maduras. Estudios realizados con diferentes tratamientos de AA, demostraron que funciona como una molécula señal, mejorando la tolerancia a los diferentes tipos de estrés, incrementa la productividad, regulando un gran número de rutas fisio-

bioquímicas en condiciones de no estrés y estrés tales como la salinidad, sequía y temperaturas extremas (Akram *et al.*, 2017). Existen varios estudios que demuestran el efecto tanto a corto (asperjado) como a largo plazo (tratamiento en semillas) del AA. Los tratamientos a corto plazo se han realizado asperjando diferentes concentraciones de AA y aplicado de manera foliar en *Olea europea* L. observándose un incremento en la altura de la planta, número de hojas, área foliar (Mayi *et al.*, 2014). Murugan *et al.* (2012) demostraron que la aspersión foliar de AA de 400 a 660 mg L<sup>-1</sup> en *Camelia* spp. en condiciones de invernadero incrementó los pigmentos clorofílicos (clorofila a, b), la actividad de enzimas como la polifenol oxidasa, fenilalanina amonoliasa, incrementó en alcaloides y terpenos que le daban un mejor sabor a la infusión. También se observó que plantas de canola (*Brassica napus*) en condiciones de estrés hídrico y asperjadas con AA incrementaron los pesos fresco y seco de la raíz y del tallo, redujo el estrés por fotooxidación por efecto de la falta de agua (Shafiq *et al.*, 2014).

El efecto a largo plazo del AA fue demostrado en *Lens culinaris* cuando las semillas pre tratadas se germinaron en condiciones de salinidad, el AA mejoró la sobrevivencia y los componentes de productividad en contraste con las no tratadas (Alami-Milani y Aghaei-Gharachorlou, 2015). En *Heliantus annus* en condiciones de estrés hídrico se incrementó el porcentaje de germinación en semillas pretratadas con AA, así como el peso fresco y seco del tallo (Fatemi, 2014). Interesantemente, en plántulas pretratadas con AA y sembradas en condiciones de estrés por sal, el AA incrementó la concentración de prolina, incremento el contenido relativo de agua, clorofila, actividad de enzimas antioxidantes (Agami, 2014).

### **5.7. Efecto del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reducción de síntomas de SPMP**

Recientemente se ha probado el efecto a corto plazo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dehidroascorbato (DHA) y largo plazo del AS en la disminución de los síntomas a fitoplasma (Romero-Romero y López-Delgado, 2009; Sánchez-Rojo *et al.*, 2011) y en la tolerancia a estrés hídrico en plantas de papa infectadas con fitoplasma (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012) en estos trabajos se ha demostrado que existe una reducción de los síntomas asociados con un incremento de la actividad antioxidante y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando en un incremento de la productividad y calidad del tubérculo.

Se ha demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa el contenido de clorofila en plantas infectadas por fitoplasma resultando en un aumento en el peso y el contenido de almidón de los minitubérculos (López-Delgado *et al.*, 2005; Romero-Romero y López-Delgado, 2009). En el cultivo de papa, se han venido estudiando nuevas alternativas para incrementar la producción a través de las respuestas oxidativas y antioxidativas naturales en las plantas, para ser usadas y manipuladas en el manejo integrado (Romero-Romero y López-Delgado, 2009).

### **5.8. Efecto de las bacterias en las relaciones hídricas**

El estatus hídrico en el tejido de las plantas es determinante en la interacción planta-patógeno. La disponibilidad del agua, es uno de los factores que facilita la replicación de la bacteria tanto en la superficie como en la parte interna de las plantas. Por lo tanto, es fundamental determinar el estado hídrico en el sistema suelo planta-atmósfera para determinar su influencia en la relación planta-patógeno (Fatima y Senthil-Kumar, 2017). El agua como un factor limitante, es diferencialmente manipulada tanto por la planta, como por el patógeno durante la infección compatible o

incompatible. Las bacterias foliares y vasculares emplean diferentes estrategias para alterar el estatus hídrico de la planta y eventualmente establecer la infección. Los patógenos foliares, manipulan su propia maquinaria en respuesta a una limitación de agua por parte de la planta. Ellos también modulan la maquinaria de la planta para promover enfermedades para promover rupturas celulares y seguir absorbiendo agua y nutrientes. Similarmente, los patógenos vasculares usan diferentes estrategias tales como obstrucción y embolismo de los vasos que conduce al marchitamiento de la planta (Fatima y Senthil-Kumar, 2017). Las bacterias patógenas asociadas al sistema vascular están entre las más devastadoras debido a que dañan el xilema y elementos traqueales que están involucrados en el transporte de agua y minerales desde la raíz a diferentes órganos fotosintéticos. La homeostasis de la planta se ve comprometida por el déficit de agua por la infección bacteriana, por lo tanto la planta emplea energía y mecanismos de defensa en protegerse del estrés hídrico más que por el patógeno, esta acción provee oportunidad a la bacteria de invadir otros tejidos que no eran accesibles fácilmente (Fatima y Senthil-Kumar, 2017). Las estrategias de las bacterias patógenas involucran la producción de polímeros higroscópicos que obstruyen las vesículas del xilema como se observó con *Ralstonia solanacearum* (agente causal del marchitamiento del tomate), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (agente causal del cancro del tomate, y *P. stewartii* subsp. *stewartii* (Mansfield *et al.*, 2012).

Las plantas emplean diferentes mecanismos de defensa para evadir la invasión. Algunas estrategias de defensa operan a través de varias rutas metabólicas, las cuales limitan la disponibilidad de agua, una desecación en el sitio de infección, es la estrategia más efectiva que restringe la multiplicación bacteriana. La conductancia estomática es regulada críticamente por la planta, modulando el estatus hídrico para

restringir la replicación de la bacteria. Las plantas cierran el estoma para limitar la disponibilidad del agua en el apoplasto de las células que se encuentran bajo la infección bacteriana (Melotto *et al.*, 2008). Las respuestas de las plantas contra los patógenos involucran el cierre estomático, la pérdida del agua del apoplasto y la reducción en la conductancia de agua en el xilema. Las plantas inducen el cierre estomático después de reconocer las moléculas efectoras producidas por las bacterias patógenas. Estudios previos demostraron una reducción en la transpiración, conductancia estomática y abertura del estoma en *Arabidopsis* después de lagunas infiltraciones con efectores *avrRpt2* y *avrRpm1* provenientes de *P. syringae*, demostrando el impacto sobre la regulación de los estomas limitando el agua hacia el apoplasto (Freeman y Beattie 2009). También se ha observado, que los fitoplasmas están asociados con cambios en los procesos fotosintéticos promoviendo alteraciones en la conductancia estomática en *Cocos nucífera* como lo sugiere Leon *et al.* (2012). Hasta el momento son nulos los trabajos sobre efecto que tiene la infección con *Ca. Liberibacter solanacearum* en la conductancia estomática y potencial hídrico de plantas de papa.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico

Se colectaron plantas de papa en campo del clon 981819 con síntomas de punta morada; se verificaron positivas y negativas a la amplificación *Ca. Liberibacter* por PCR. Los genotipos positivos y negativos se incluyeron al banco de germoplasma *in vitro* del Programa de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Metepec, Edo. Méx. Las microplantas con amplificación positiva y negativa a *Ca. Liberibacter solanacearum* y libres de virus (ELISA), se propagaron *in vitro* por el método descrito por Espinoza *et al.* (1986).

### 6.2. Etapa 1: Experimentos *in vitro*

Aproximadamente 80 esquejes provenientes de vitroplantas infectadas con *Ca. Liberibacter* se subcultivaron durante 30 días en medio MS adicionando AS 0.001 mM (Sánchez-Rojo *et al.*, 2011); otro grupo de 80 esquejes previamente incubados durante una hora en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM (Mora-Herrera y López-Delgado, 2007) se subcultivaron en medio MS durante 30 días; el tercer tratamiento constó de esquejes previamente incubados durante una hora en una solución de 6 µM de DHA y después fueron subcultivados en medio MS durante 30 días. Se utilizaron plantas de *Solanum tuberosum* infectadas y no infectadas con *Ca. Liberibacter* sin ningún tratamiento como plantas testigo. A los 30 días del subcultivo y tratamiento con moléculas señal, se cuantificó la actividad enzimática de CAT, POX, calosa sintetasa, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y deposición de calosa en tubos cribosos, contenido relativo de clorofila, peso fresco y longitud del tallo de las vitroplantas. Se realizaron tres experimentos, utilizando tres vitroplantas por tratamiento para la determinación bioquímica e histoquímica.

### **6.3. Etapa 2 y 3: Experimentos en invernadero**

#### **6.3.1. Etapa 2: Efecto a largo plazo (pretratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Se utilizaron 15 vitroplantas por cada tratamiento de 30 días de edad previamente pretratadas con AS, DHA o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenientes de la etapa 1. Las vitroplantas se trasplantaron en macetas (16 cm de ancho por 12 cm de profundidad) en una mezcla 2:1 de "peat moss" y agrolita volumen/volumen. Las macetas con plantas se mantuvieron en un invernadero a una temperatura de 14-26 °C bajo fotoperiodo natural. Las plántulas se dejaron crecer por un periodo de 90 días. A los 73 días después del trasplante (DDT) se determinó la actividad enzimática de CAT, POX, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actividad de la calosa sintetasa, deposición de calosa, potencial hídrico, conductancia estomática y contenido relativo de clorofila. Se utilizaron cinco vitroplantas por tratamiento para determinar los parámetros agronómicos a los 73 DDT como altura del tallo, diámetro del sexto entrenudo, peso seco, peso fresco. La productividad (peso y número de minitubérculos) de 10 plantas se determinó a los 120 DDT. A los 120 días después de la cosecha se evaluó la brotación de los minitubérculos.

#### **6.3.2. Etapa 3: Efecto a corto plazo (aspersión con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Esquejes provenientes de plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* se subcultivaron en medio MS, posteriormente fueron trasplantadas a invernadero y asperjadas cada tercer día a partir de los 30 DDT con AS 0.001 Mm (Sánchez-Rojo *et al.*, 2011); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (Romero-Romero y López-Delgado, 2009) 3.4 mM de DHA (Romero-Romero y López-Delgado, 2009) hasta los 90 DDT. El diseño utilizado fue completamente aleatorio. Se utilizaron 15 plantas por cada tratamiento incluyendo a las plantas testigo infectadas y no infectadas.

Se evaluaron las mismas variables establecidas, con el mismo número de plantas que se utilizaron en el experimento a largo plazo y en las mismas fechas (73 DDT) para variables bioquímicas, asociadas a fotosíntesis y agronómicas, mientras que para el número y peso de los minitubérculos fue a los 120 DDT. A los 120 días de la cosecha se evaluó la brotación de los minitubérculos.

#### **6.4. Procedimientos de análisis**

##### **6.4.1. Extracción de ADN por el método CETAB**

Para la determinación de *Ca. Liberibacter* se realizó la extracción del ADN por la técnica de CTAB. Aproximadamente 250 mg de tejido (hojas y tallo de plantas *in vitro*) se molieron con 1 mL de buffer de extracción. Las muestras se incubaron a 65 °C por 1.30 h. Se agregaron 0.75 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron las muestras por inmersión. Se centrifugaron durante 5 minutos a 10 000 g. Del sobrenadante se tomaron 0.650 mL y se agregó la misma cantidad de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), en este caso 0.650 mL, y se agitó por inmersión. Se centrifugó 5 min a 10 000 g. A 0.5 mL del sobrenadante se le agregó 166.6 µL de acetato de amonio 7.5 M. Las muestras se incubaron 10 minutos en hielo, posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 14 000 g. El sobrenadante se transfirió por inversión y se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol frío. Por 0.4 ml de sobrenadante se agregó 0.240 mL de isopropanol. Se agitó por inversión y se dejó toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 10000 g por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 0.7 mL de etanol al 70% y se agitó suavemente por inversión. Se centrifugó 10 minutos a 10000 g y se desechó el sobrenadante por vaciado. La pastilla se volvió a lavar agregando 0.700 mL de etanol al 70% y se agitó suavemente por inversión,

posteriormente se centrifugó a 10 000 g. Se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet por inversión sobre papel secante (aproximadamente 30 min). La pastilla se resuspendió en 50 µL de agua MilliQ.

#### **6.4.2. Detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* en microplantas**

El ADN obtenido, se amplificó en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la modalidad de PCR secuencial para detectar la presencia *Ca. Liberibacter* se utilizaron los *primers* Lp Frag 1-(25 F)/Lp Frag 1-(427R) y Lp Frag 2-(266 F)/LP Frag 2-(1138R) de acuerdo a Hansen *et al.* (2008).

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0.5 mL; el volumen total de la reacción fue de 25 µL [50 ng de DNA, 1X amortiguador, 12.5 picomoles de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP (A, T, C, G), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1.5 Unidades de la enzima Taq DNA polimerasa (marca Gibco). Los PCR's se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research con el programa: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C de 2 min y 35 ciclos adicionales con el siguiente programa: 1 min de desnaturalización a 94 °C; 30 s de apareamiento a 50 °C; 1.5 min de polimerización a 72 °C; y una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se fraccionaron en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador TAE 0.05 %, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizaron bajo luz ultravioleta (Almeyda, *et al.*, 2001).

#### **6.4.3. Determinación de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Para encontrar los rangos de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tejido de hoja, se realizó una curva con concentraciones de 882, 441, 220, 88.2 y 44.1 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cuales se diluyeron 1:6 con 5 % de TCA, esa dilución se volvió a diluir 1:7 en 5 % de TCA, de esta

muestra se tomó 500  $\mu\text{L}$  y se agregó 500  $\mu\text{L}$  de luminol (0.5 mM, diluido en  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.2 M pH 9) y 4.5 mL de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 0.2 M pH 9), de esta mezcla se tomó 450  $\mu\text{L}$  para la lectura final en el luminómetro. La quimioluminiscencia se inició por inyección de 50  $\mu\text{L}$  de ferrocianuro de potasio (0.5 mM, disuelto en  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.2 M pH 9) y se registrara la emisión de fotones durante 5 s (Mora-Herrera *et al.*, 2007).

#### **6.4.4. Determinación de la actividad de catalasa**

La actividad enzimática de CAT se determinó en tejido de hoja, de acuerdo al método Aebi (1984), la cual consistió en moler tejido vegetal en 50 mM de fosfato de potasio pH 7.2, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 2% PVP (1 mL 0.25  $\text{g}^{-1}$  peso fresco), se centrifugó a 3000 g por 15 min. La reacción se leyó a 240 nanómetros por 3 min cada 20 s con un medio de reacción. La actividad enzimática se calculó por el coeficiente de absortividad 39.4  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### **6.4.5. Cuantificación de la actividad enzimática de la POX**

La cuantificación de la actividad enzimática de la POX por espectrofotometría se realizó de acuerdo al método descrito por Mora-Herrera y López-Delgado (2007). La extracción de proteína se realizó de la manera anteriormente descrita para CAT (Anderson *et al.*, 1995). La actividad enzimática de la POX se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, 3.33 mM de guaiacol, 4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 0.020 mL de la muestra en un volumen final de 3 mL. La reacción se inició con la adición de la muestra a 25-28 °C. El blanco consistió en el amortiguador de reacción sin extracto de proteína. La oxidación del sustrato (guaiacol) se determinó por el incremento en la absorbancia a 470 nm durante 3 minutos en intervalos de 30 s. Para

medir la actividad de la POX se usó el coeficiente de absorptividad del guaiacol  $\epsilon = 2.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ .

#### **6.4.6. Contenido relativo de clorofila (SPAD meter)**

El contenido relativo de clorofila fue determinado con un SPAD-meter (Minolta-Konica, Japón). Se evaluó la sexta hoja completamente madura, seleccionada a partir del ápice. Las unidades fueron expresadas como unidades SPAD.

#### **6.4.7. Potencial de agua ( $\Psi_A$ ) y conductancia estomática ( $g_s$ )**

Las mediciones de potencial de agua ( $\Psi_A$ ) se hicieron con una bomba de presión tipo Scholander (Scholander *et al.*, 1965. La lámina se introdujo dentro de la cámara, dejando la parte basal expuesta (peciolo). La presión interior de la cámara se incrementó lentamente hasta obtener un balance de presión en la columna de agua del xilema en la hoja, el cual se alcanzó cuando una pequeña gota de savia apareció en la zona expuesta (Turner, 1988). La conductancia estomática fue medida mediante un porómetro de difusión (Leaf Porometer SC-1 Decagon DEVICES, Inc. U.S.A), usando la técnica del estado estacionario. Las mediciones se hicieron en la sexta hoja contando a partir del ápice que estuviera completamente madura.

#### **6.4.8. Parámetros de productividad**

Se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea de la planta. Los tallos con hojas se cosecharon y se pesaron en una balanza granataria al momento del corte, posteriormente el tejido fue colocado en bolsas de papel e introducido a una estufa

(Thelco) a temperatura constante de 60 °C hasta obtener peso constante. Las muestras secas fueron pesadas en una balanza analítica para determinar el peso seco.

Un día después de la cosecha, la cual se realizó a los 120 DDT, se evaluó el número y el peso fresco de minitubérculos por planta. El número de brotes fue determinado a los 120 días después de la cosecha. Tomando como tubérculo brotado cuando el brote alcanzo más de 2 mm.

#### **6.4.9. Análisis de microscopía para determinar deposición de calosa**

Para realizar la técnica detección de calosa por epifluorescencia, se tomaron aproximadamente 0.5 cm<sup>3</sup> de tejido vegetal del cuarto entrenudo de la vitroplanta, éste se fijó en una solución de FAA (Formol 10%, Alcohol etílico 50%, Ac. Acético glacial 5%, Agua destilada 35%) al menos durante 48 horas. Posteriormente cada muestra de tejido se deshidrató en diferentes soluciones de alcoholes etílicos graduales (30, 50, 70, 80, 96 y 100%) y una solución de alcohol-xilol, xilol puro, xilol-parafina por dos horas en cada uno. Al terminar se hizo la inclusión en parafina al 100% durante 24 h. Posteriormente, se realizaron los cortes histológicos a un grosor de 10 micrómetros en un micrótomo manual American Optical 820. Los cortes se montaron en un portaobjetos para posteriormente ser desparafinados (López *et al.*, 2005). Para la detección de calosa, los cortes se tiñeron por 1 minuto en una solución de azul de anilina 1% (w/v) y ácido acético 1% (w/v). El tejido se analizó por epifluorescencia (con filtros de 365, 395 y 397 nm) usando un microscopio Axioscope (Voigt *et al.*, 2006).

#### **6.4.10. Actividad de la calosa sintetasa por gel nativo de actividad**

La determinación de la actividad de la calosa sintetasa se hizo de acuerdo al método de Valluri y Soltes, (1990). El tejido usado fue de la misma zona de donde se realizaron los cortes histológicos. Se colectaron 100 mg de tejido el cual se lavó con agua destilada. Posteriormente el tejido se macero en una solución amortiguadora de 125 mM de Tris-HCL pH 6.8 que contenía 10% de glicerol y 1% de digitonin, el extracto se centrifugó a 13000 g por 5 minutos. Al sobrenadante se le cuantificó la proteína soluble con un nanodrop (Thermo-Scientific). Se utilizaron 50 µg de proteína del extracto, que se usaron para cargar los pozos del gel. El gel de acrilamida (4.5% apilamiento y 7.5% de corrida) fue corrido a 15 mA por gel durante 100 minutos. Posteriormente los geles se colocaron en recipientes de plástico con una solución de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 por un periodo de 30 minutos. Posteriormente, los geles fueron enjuagados con un lavado de agua destilada e incubado en una solución de 50 mM Tris-HCl pH 7.5 que contenía 3 mM de  $\text{NaN}_3$ , 5 mM de UDP-glucosa (no marcada) y cofactores como 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 10 mM de celobiosa por un periodo de 30 minutos. Posteriormente, los geles se tiñeron con 100 mL de una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 que contenía 0.1% de calcofluor. Los geles se destiñeron con una solución de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 durante dos horas en agitación continua. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### **6.4.11. Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente aleatorio. Se realizaron por lo menos tres experimentos y cada variable se cuantificó al menos tres veces. Las variables continuas fueron analizadas por medio de la prueba ANOVA ( $P \leq 0.05$ ), en algunos casos los promedios de los tratamientos se analizaron con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), mediante el programa Statgraphics plus 5.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Etapa 1: Experimentos *in vitro*

#### 7.1.1. Actividad POX, CAT y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se determinó la actividad de la enzima POX, CAT y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en vitroplantas de 30 días de subcultivo infectadas y no infectadas con *Ca. Liberibacter*, previo a los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observó, que las vitroplantas positivas a *Ca. Liberibacter* disminuyeron significativamente la actividad de CAT (Figura 1A), incrementaron la actividad de POX (Figura 1B) así como la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 1C) significativamente con respecto a las vitroplantas sanas.

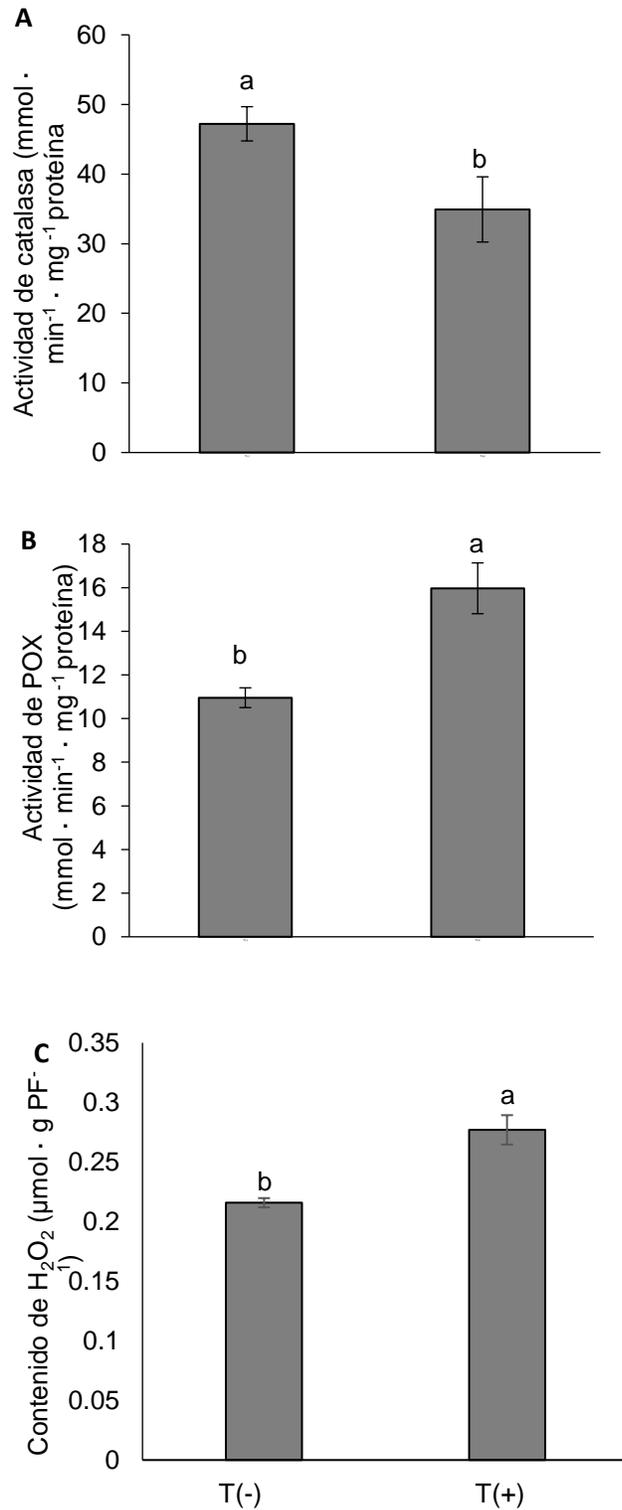


Figura 1. Actividad de la enzima CAT (A), POX (B) y concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (C) en vitroplantas negativas y positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum* a los 30 días después de subcultivarlas. Datos son promedios  $\pm$  ES,  $n=9$ . Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

### 7.1.2. Actividad de calosa sintetasa y deposición de calosa

Se logró la visualización de las bandas de actividad de calosa sintetasa en plantas positivas y negativas a *Ca. Liberibacter*, observándose que la actividad de la calosa sintetasa en plantas enfermas, fue significativamente menor que en las plantas sanas (Figura 2A, B). Se encontró en cortes de tallo menor acumulación de calosa en tubos cribosos en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* (Figura 3) en contraste con las plantas no infectadas, como se observa en las micrografías tomadas con microscopio de fluorescencia. La calosa se visualiza por coloración verde fluorescente debido a la epifluorescencia (Figura 3).

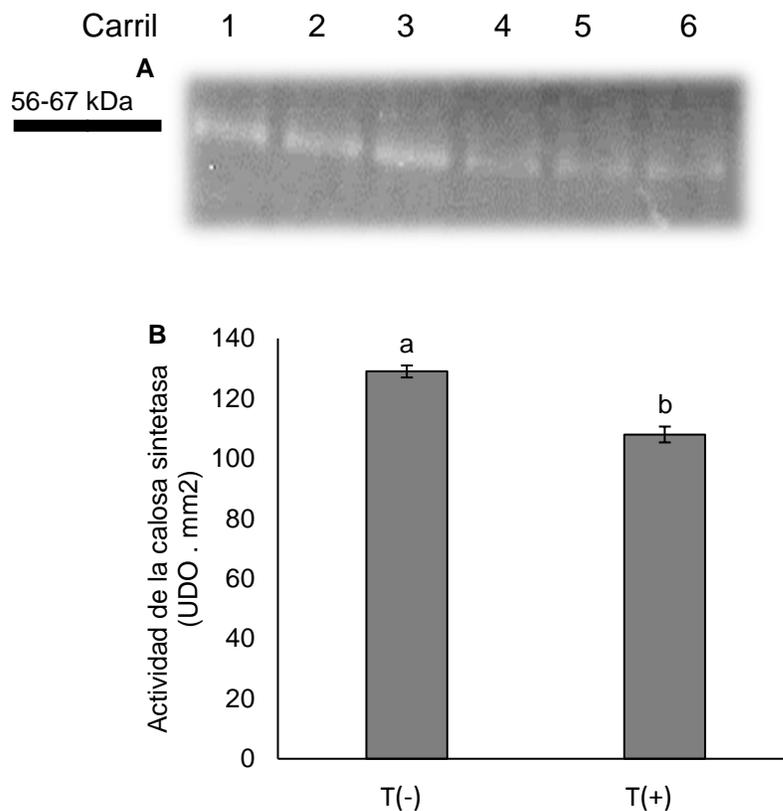


Figura 2. Gel nativo de actividad de calosa sintetasa (A) y densidad óptica de las bandas de vitropiantas del clon 981819 negativas (carril 1-3) y positivas (carril 4-6) a *Ca. Liberibacter*. Datos son promedios  $\pm$  ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

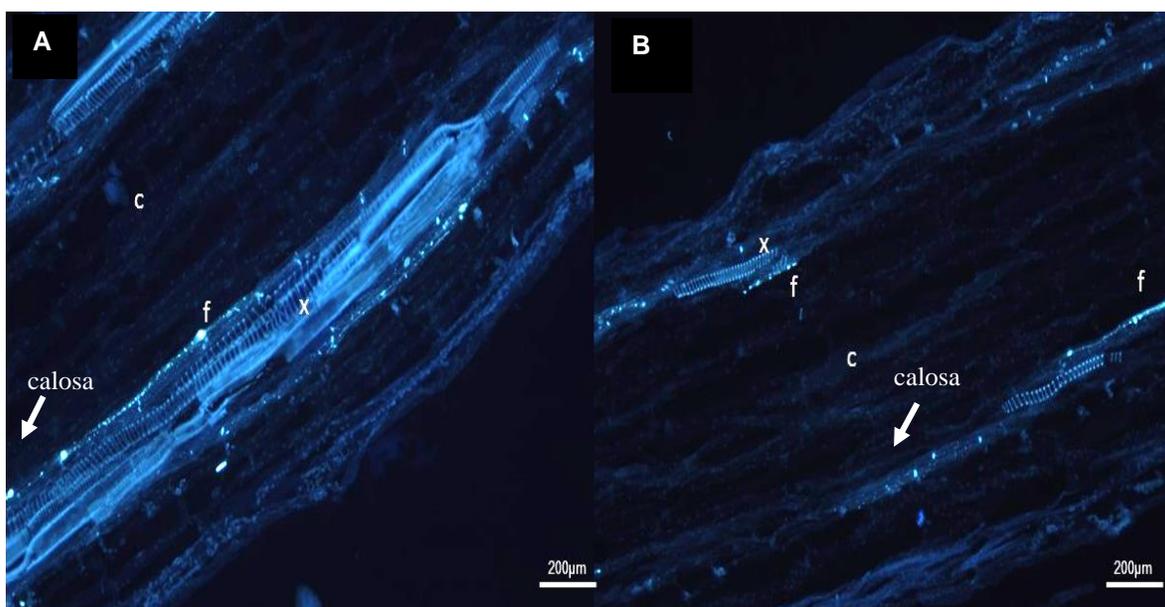


Figura 3. Micrografías con microscopio de fluorescencia del cuarto entrenudo de tallos de vitroplantas de 30 días de subcultivarlas tomadas a 20x. (A) plantas negativas a *Ca. Liberibacter*; (B) plantas positivas a *Ca. Liberibacter*. x) xilema, f) floema, c) córtex.

### 7.1.3. Efectos de los tratamientos de AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en vitroplantas infectadas y no infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum*

#### 7.1.4. Actividad enzimática de CAT, POX y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se determinó que el AS no incrementó la actividad de la CAT significativamente con respecto a las vitroplantas testigos infectadas; sin embargo, se observó un incremento no significativo en las vitroplantas tratadas con AS en contraste con las vitroplantas infectadas (Figura 4A). Los tratamientos con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente la actividad de la CAT en contraste con las vitroplantas positivas a *Ca. Liberibacter*, incluso igualando la actividad de las plantas testigo no infectadas (Figura 4A).

En plantas no infectadas con *Ca. Liberibacter*, la actividad de POX fue significativamente menor en contraste con las vitroplantas positivas; sin embargo, ninguno de los tratamientos redujo o incremento significativamente la actividad de POX

en las plantas infectadas (Figura 4B). El tratamiento con  $H_2O_2$  incremento significativamente la actividad de POX con respecto a las plantas tratadas con AS (Figura 4B).

Las vitroplantas tratadas con AS, DHA y  $H_2O_2$  presentaron concentraciones similares de  $H_2O_2$  con respecto al testigo positivo; sin embargo fueron significativamente más altos con respecto al testigo negativo. Se determinó una correlación negativa entre la actividad CAT y la concentración de  $H_2O_2$ , los tratamientos incrementan la actividad de CAT en plantas enfermas con respecto a las enfermas sin tratamientos; mientras que mantienen elevada concentración de  $H_2O_2$  (Figura 4C).

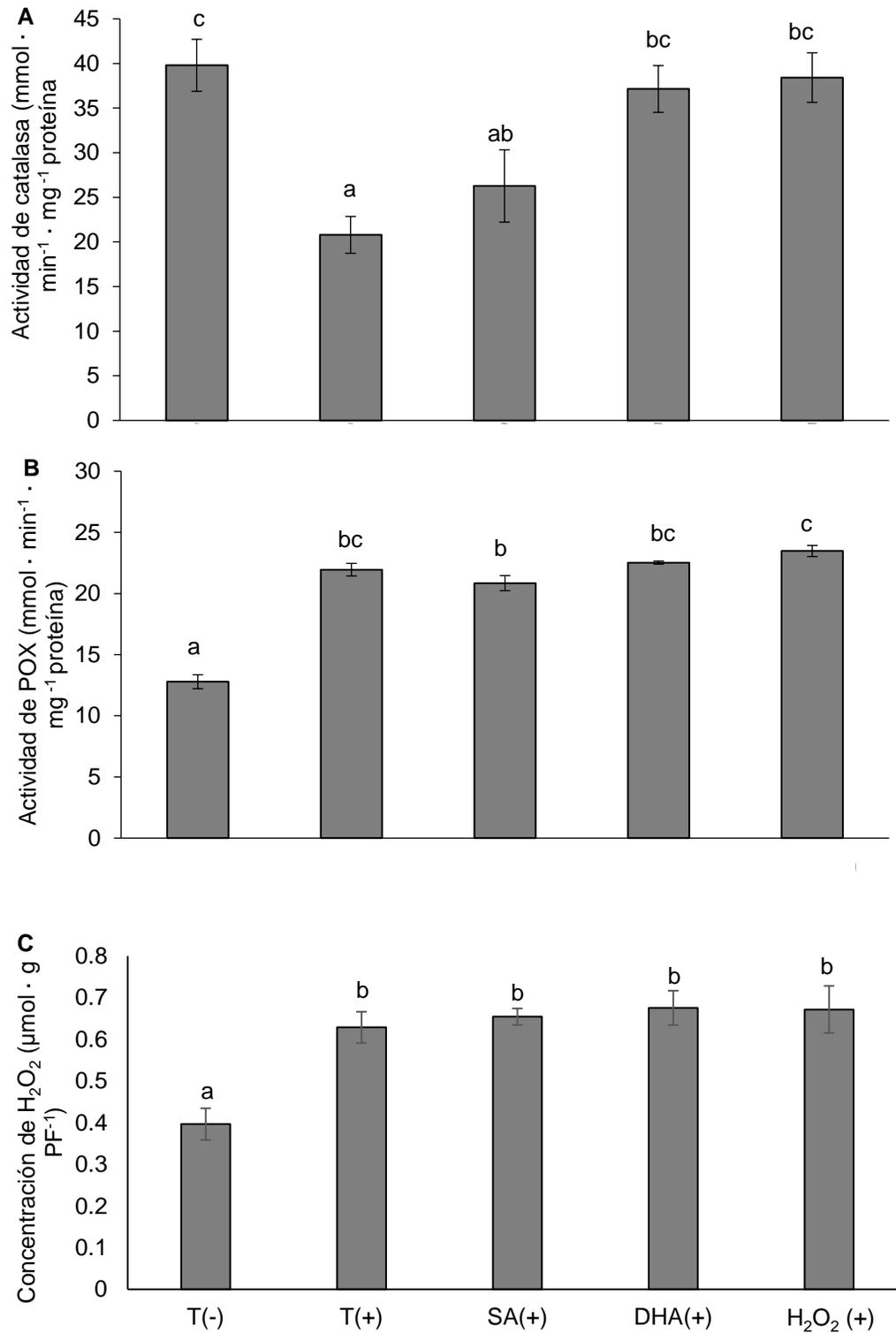


Figura 4. Actividad de CAT (A), POX (B) y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) en vitroplantas positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum* y tratadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los 30 días después de los tratamientos en condiciones *in vitro*. Datos son promedios ± ES, n=9.

Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

### 7.1.5. Actividad de calosa sintetasa de plantas *in vitro* e incubadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

EL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó la actividad de calosa sintetasa similar a las plantas testigoS no infectadas (Fig. 5 A, B). Se observó una reducción en la acumulación de calosa en el floema del cuarto entrenudo en las microplantas infectadas y tratadas con AS y DHA (Figura 6C, E). En éste estudio, se observó una mayor acumulación de calosa y actividad de calosa sintetasa cuando las microplantas fueron incubados en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 5 A, B). En las plantas no infectadas se observó una mayor actividad de calosa sintetasa y deposición de calosa (Figura 5A, B; 6A).

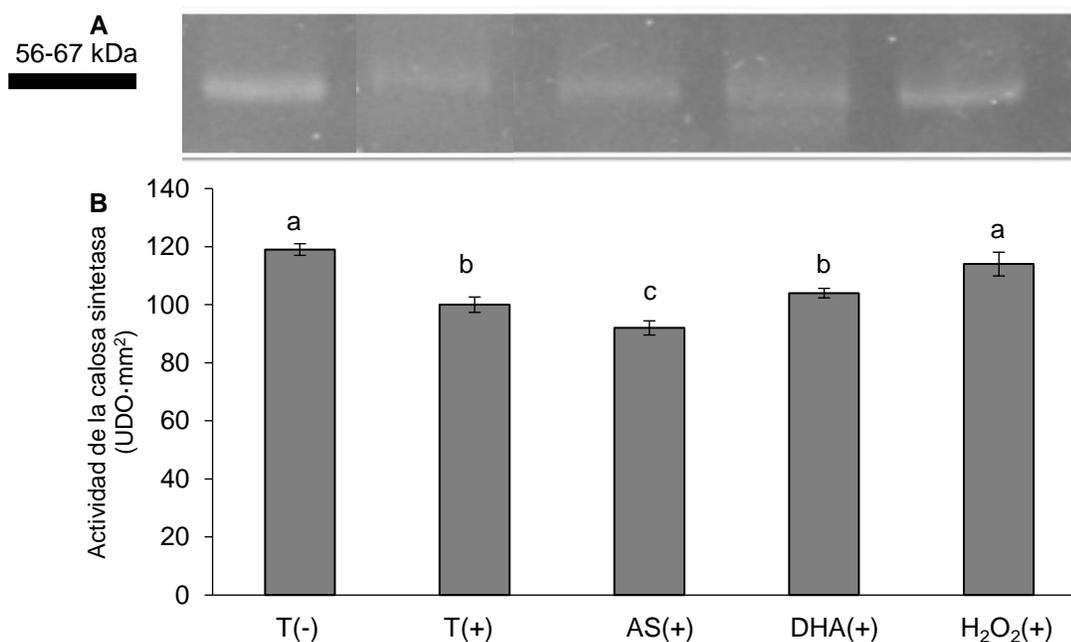


Figura 5. Actividad de calosa sintetasa. (A) Gel nativo de actividad, (B) Densidad óptica de las bandas por tratamiento de microplantas infectadas y no infectadas, previamente tratadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHA. Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

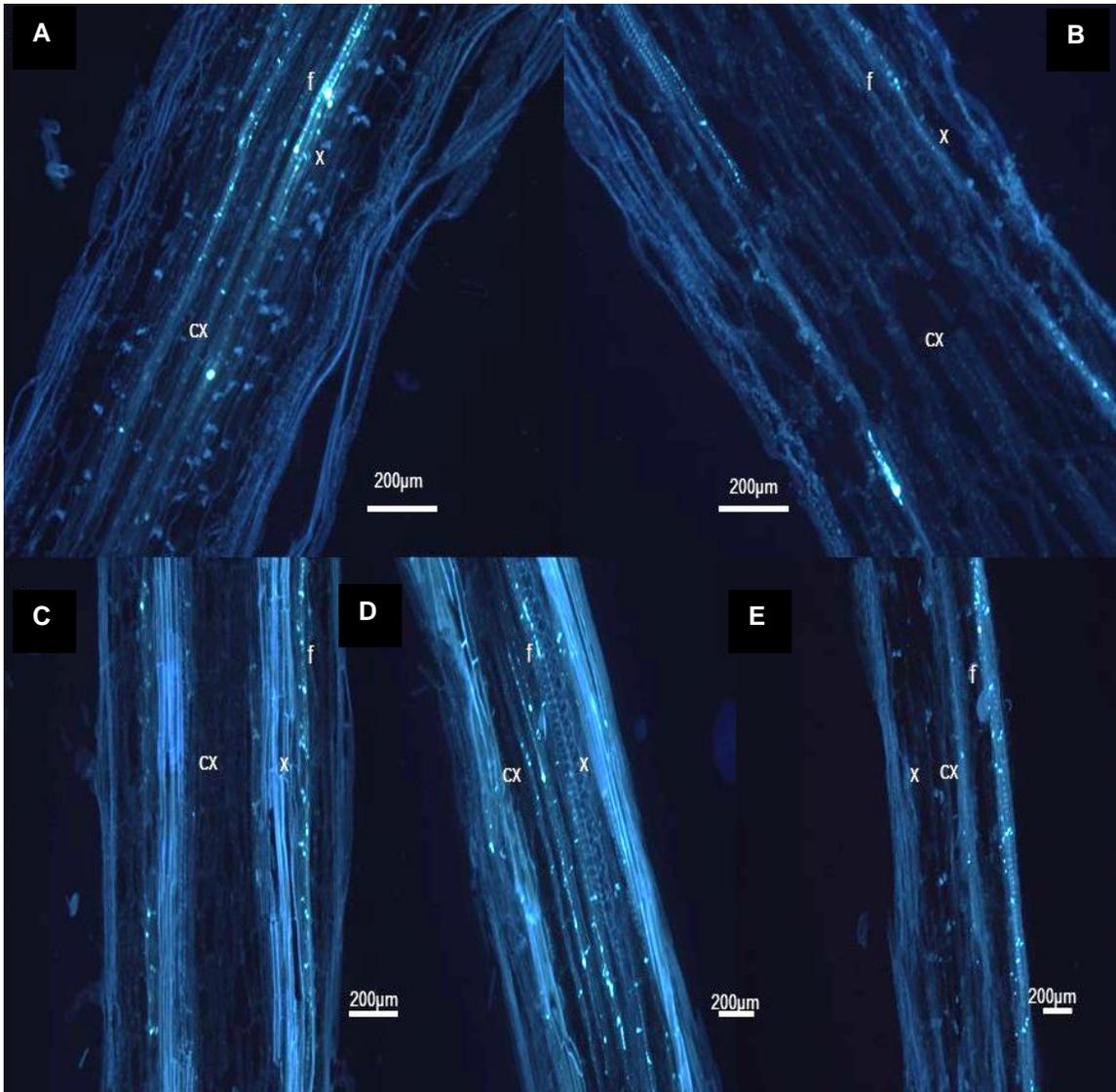


Figura 6. Efecto de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHA en la acumulación de calosa en vitroplantas de papa cultivadas a los 30 días. Vitroplantas sanas (A), Vitroplantas infectadas (B), Infectadas tratadas con AS (C), Infectadas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D), Infectadas tratadas con DHA (E). Floema del Sistema vascular (f), Córtex (cx), xilema (x). Barra = 200μm

### **7.1.6. Peso fresco, longitud del tallo y contenido relativo de clorofila de las vitroplantas**

Las vitroplantas infectadas con *Ca. Liberibacter*, presentaron una reducción significativa en el peso fresco con respecto a las plantas no infectadas. Los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujeron un incremento en peso fresco de manera significativa (Figura 7A) comparadas con las vitroplantas no infectadas e infectadas por la bacteria. En este trabajo, se observó que el DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron los tratamientos que más incrementaron el peso fresco de manera significativa en comparación con el tratamiento de AS y las vitroplantas testigo. (Figura 7A). Una de las características asociadas con el SPMP es la reducción significativa en la altura de la planta producto de la infección (Figura 7B). Los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron la altura del tallo significativamente en condiciones de *in vitro* comparado con las vitroplantas infectadas (Figura 7B). Sin embargo, es importante recalcar el efecto del DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a que se observó que estas dos moléculas fueron las que más incrementaron la altura del tallo superando a las vitroplantas testigo no infectadas (Figura 7B).

Finalmente, el contenido de clorofila se redujo significativamente en vitroplantas infectadas con *Ca. Liberibacter* en comparación con las negativas. Todos los tratamientos con las moléculas señalizadoras incrementaron significativamente el contenido relativo de clorofila (Figura 7C), incluso superando a los encontrados en las plantas testigos infectadas.

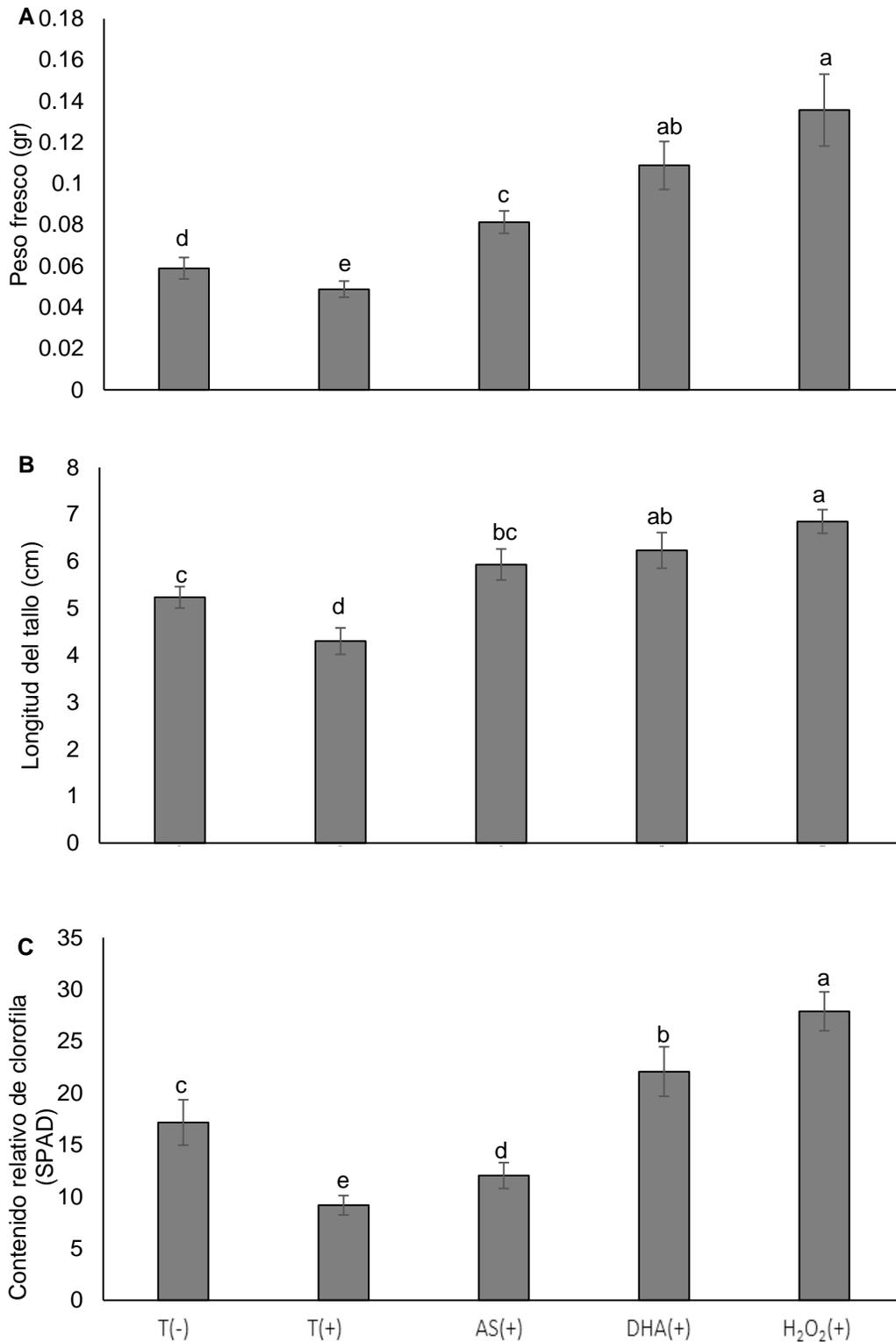


Figura 7. Peso fresco (A), altura del tallo (B) y contenido relativo de clorofila (C) en vitroplantas positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum* y tratadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los 30 días después de los tratamientos en condiciones *in vitro*. Datos son promedios  $\pm$  ES, n=15. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

## **7.2. Etapa 2 y 3: Experimentos de invernadero**

### **7.2.1. Etapa 2: Efecto a largo plazo (pretratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

#### **7.2.1.1. Actividad enzimática de la CAT, POX y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Las plantas no infectadas e infectadas no presentaron diferencias significativas en la actividad enzimática de POX. El pretratamiento con AS incrementó significativamente la actividad de POX respecto a las tratadas con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El pretratamiento con DHA redujo significativamente la actividad con respecto a los otros tratamientos (Figura 8A). En plantas no infectadas, infectadas y pretratadas con AS no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de CAT; sin embargo los pretratamientos con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente la actividad de CAT (Figura 8B). Se observaron diferencias significativas en los pretratamientos con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue más alta con respecto a las del testigo no infectadas; sin embargo las plantas pretratadas con AS presentaron concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similares al testigo no infectadas (Figura 8C). Interesantemente podemos observar una relación entre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad de CAT entre las plantas pretratadas con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

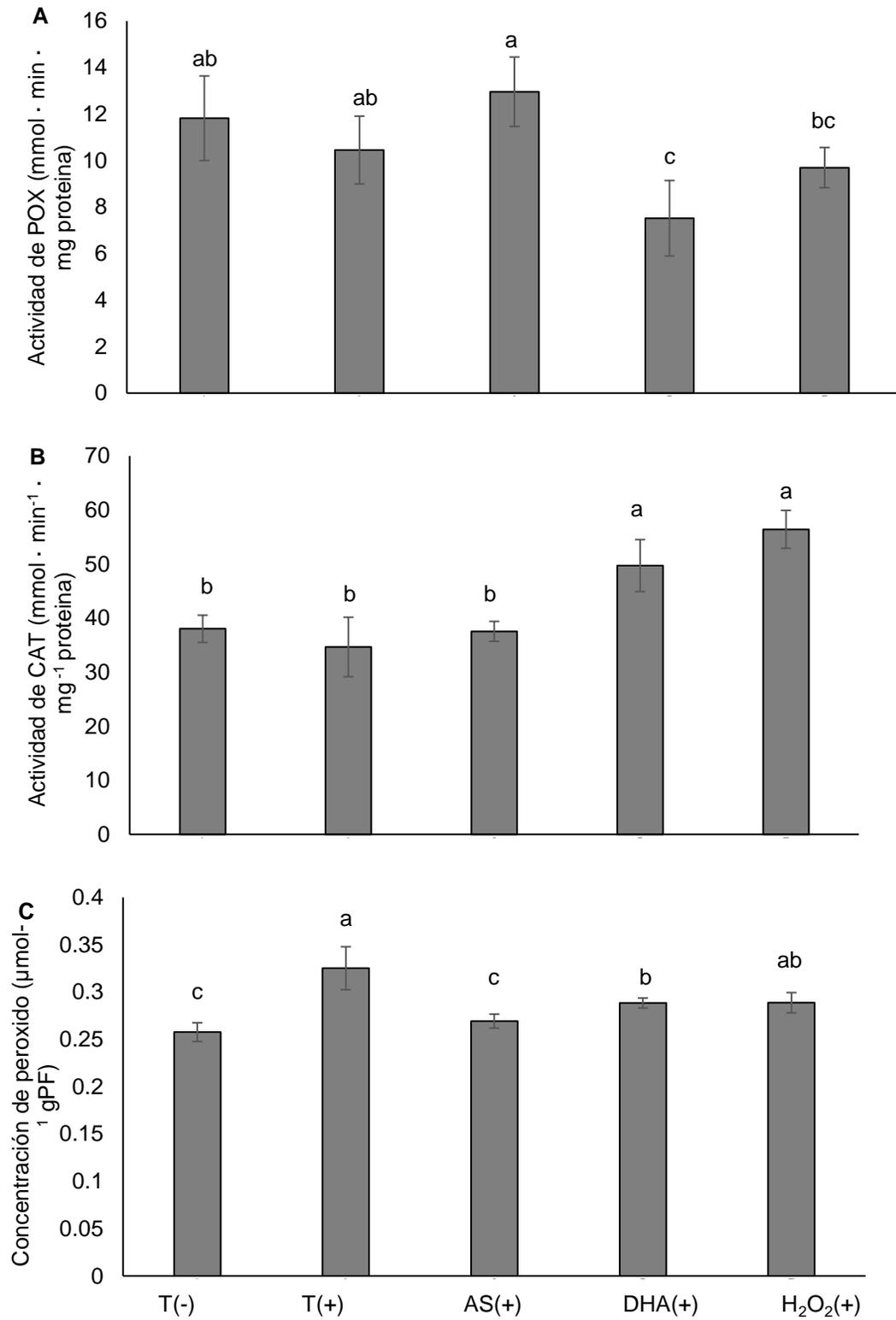


Figura 8. Actividad de POX (A), CAT (B) y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y pretratadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

### 7.2.1.2. Actividad de la calosa sintetasa y deposición de calosa

No se observaron cambios significativos en la actividad de la calosa sintetasa con ninguno de los pretratamientos (Figura 9A, B). Sin embargo, los tratamientos con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron de manera no significativa la actividad de la calosa sintetasa (Figura 9A, B). Se observó una deposición de calosa en todos los tratamientos de manera uniforme incluyendo en las plantas infectadas y no infectadas (Figura 10)

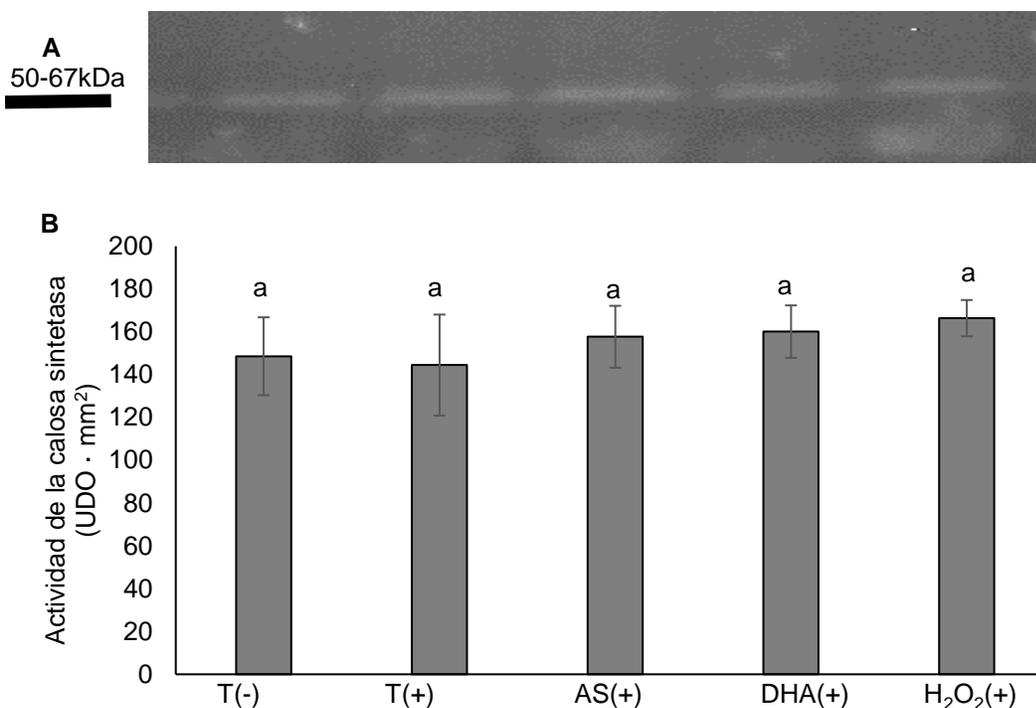


Figura 9. Actividad de calosa sintetasa. (A) Gel nativo de actividad, (B) densidad óptica de las bandas por tratamiento en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y pretratadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

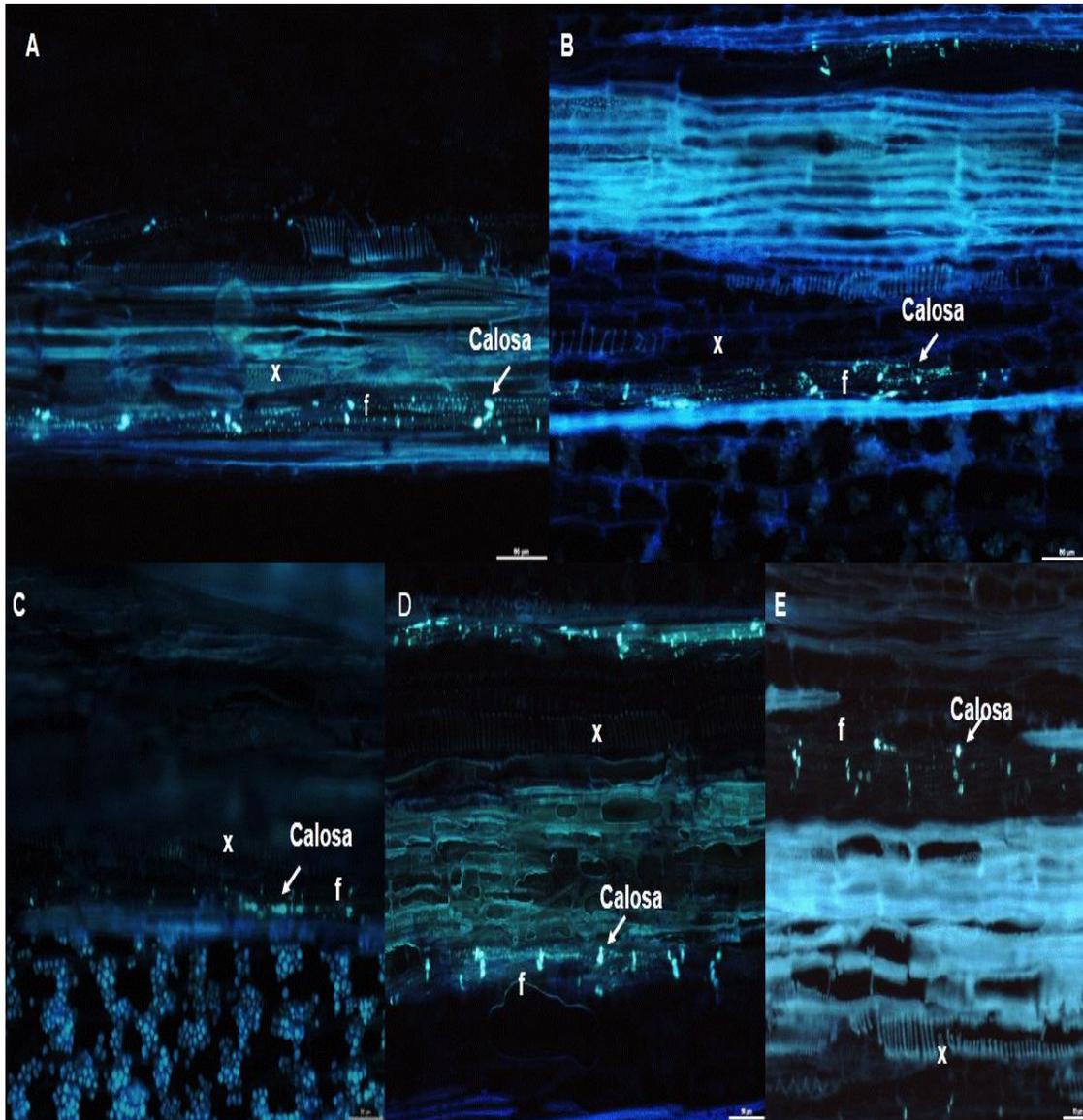


Figura 10 .Efecto de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHA en la acumulación de calosa en plantas sanas (A), infectadas (B), y pretratadas con AS (C), DHA (D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E). Floema del Sistema vascular (f), xilema (x). Barra = 80μm.

### 7.2.1.3. Potencial hídrico ( $\Psi_A$ ) y conductancia estomática (gs)

Las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* presentaron un mayor  $\Psi_A$  con respecto a las no infectadas (Cuadro 1); sin embargo, los pretratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron el  $\Psi_A$  con respecto a las plantas sanas, pero fueron significativamente más bajos con respecto a las plantas enfermas (Cuadro 1). Las

plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* redujeron significativamente la conductancia estomática hasta en 64% (Cuadro1) con respecto a las plantas sanas; los pretratamientos con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redujeron significativamente la conductancia estomática en 43% y 34% respectivamente en contraste con las plantas positivas a *Ca. Liberibacter*. En las plantas pretratadas con DHA hubo un incremento significativo (44%) en la conductancia estomática con respecto a las plantas enfermas (Cuadro 1). Las plantas enfermas presentaron un contenido relativo de clorofila significativamente más bajo (35%) con respecto a las plantas no infectadas. Los pretratamientos contribuyeron a un incremento significativo en el contenido relativo de clorofila entre un 7 y 9% con respecto a las plantas enfermas sin tratamiento (Cuadro1).

Cuadro 1. Efecto a largo plazo del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en algunos parámetros asociados a fotosíntesis en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* a los 73 DDT en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Potencial hídrico (MPa)	Conductancia estomática (mmoles m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Contenido relativo de clorofila (unidad SPAD)
Plantas sanas	-0.72 ± 0.08 <b>a</b>	201.28 ± 18.6 <b>b</b>	40.08 ± 1.70 <b>a</b>
Plantas enfermas	-0.33 ± 0.04 <b>c</b>	74.02 ± 7.6 <b>c</b>	25.97 ± 0.58 <b>c</b>
Plantas enfermas + AS	-0.50 ± 0.04 <b>b</b>	42.40 ± 4.8 <b>d</b>	29.03 ± 0.89 <b>b</b>
Plantas enfermas + DHA	-0.43 ± 0.07 <b>c</b>	290.27 ± 39.5 <b>a</b>	29.60 ± 1.84 <b>b</b>
Plantas enfermas + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.39 ± 0.03 <b>c</b>	49.10 ± 8.6 <b>d</b>	29.28 ± 0.43 <b>b</b>

Datos son de 3 experimentos n=15 ± ES. Diferentes letras denotan diferencias significativas (P≤0.05)

#### 7.2.1.4. Efecto del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el peso fresco y seco de las plantas

El peso fresco de plantas infectadas fue similar al de las plantas sanas testigo; sin embargo, los pretratamientos con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente el peso fresco con respecto a las plantas infectadas en un 38 y 34.16% respectivamente (Figura 11A). Interesantemente el pretratamiento con DHA incremento el peso fresco

(12.5%) aunque de manera no significativa respecto a las plantas control infectadas. Resultados similares fueron obtenidos con el peso seco de la planta (Figura 11B). En este trabajo, no se observaron diferencias significativas en el peso seco entre plantas infectadas, sanas y pretratadas con DHA; es importante hacer mención, que los pretratamientos con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente la materia seca en un 50 y 52.3% respecto a las plantas testigo infectadas (Figura 11B).

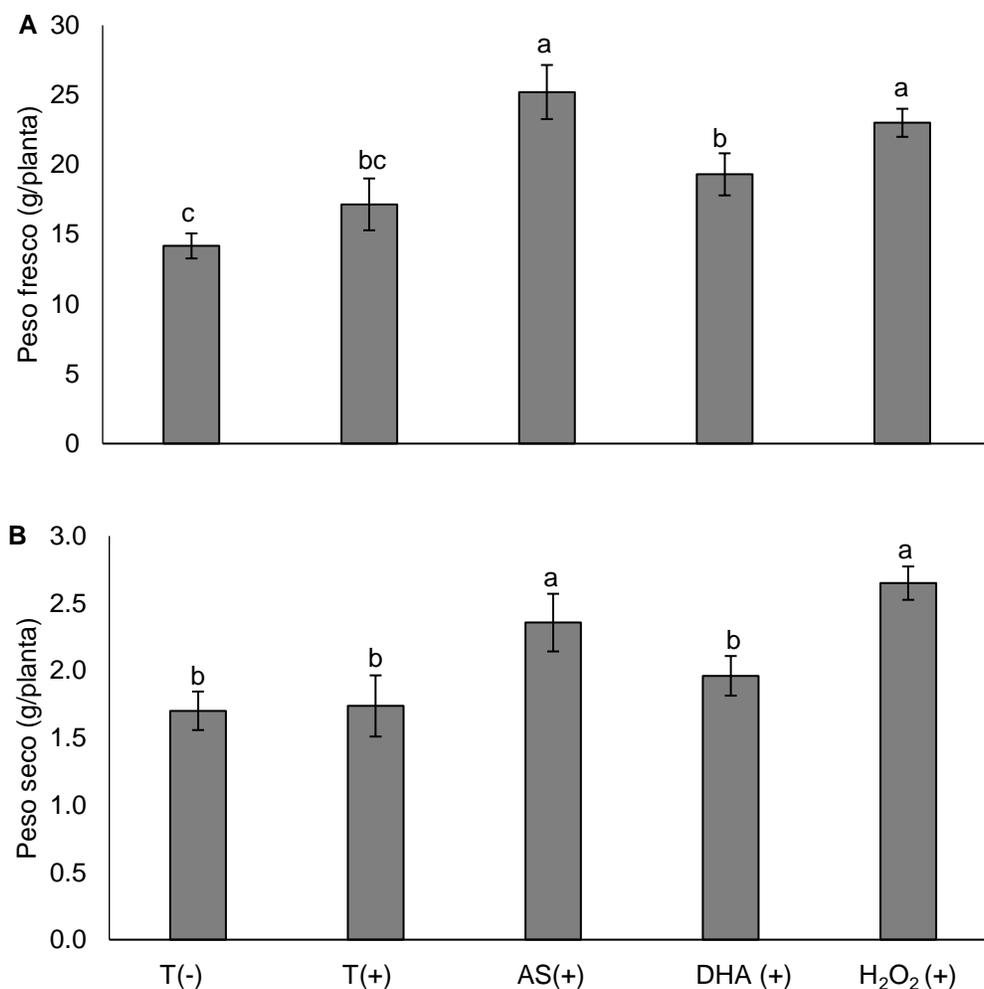


Figura 11. Peso fresco (A), y peso seco (B) en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y pretratadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=15. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

### 7.2.1.5. Efecto del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la altura y diámetro del tallo

Los pretratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tuvieron efectos significativos en la altura de la plantas con respecto a las plantas testigo infectadas; sin embargo, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó significativamente la altura del tallo con respecto a las plantas tratadas con AS (Figura 12A). Las plantas testigo no infectadas fueron significativamente más altas en contraste con las infectadas. El diámetro del sexto entrenudo fue significativamente reducido con el pretratamiento de AS (Figura 12B).

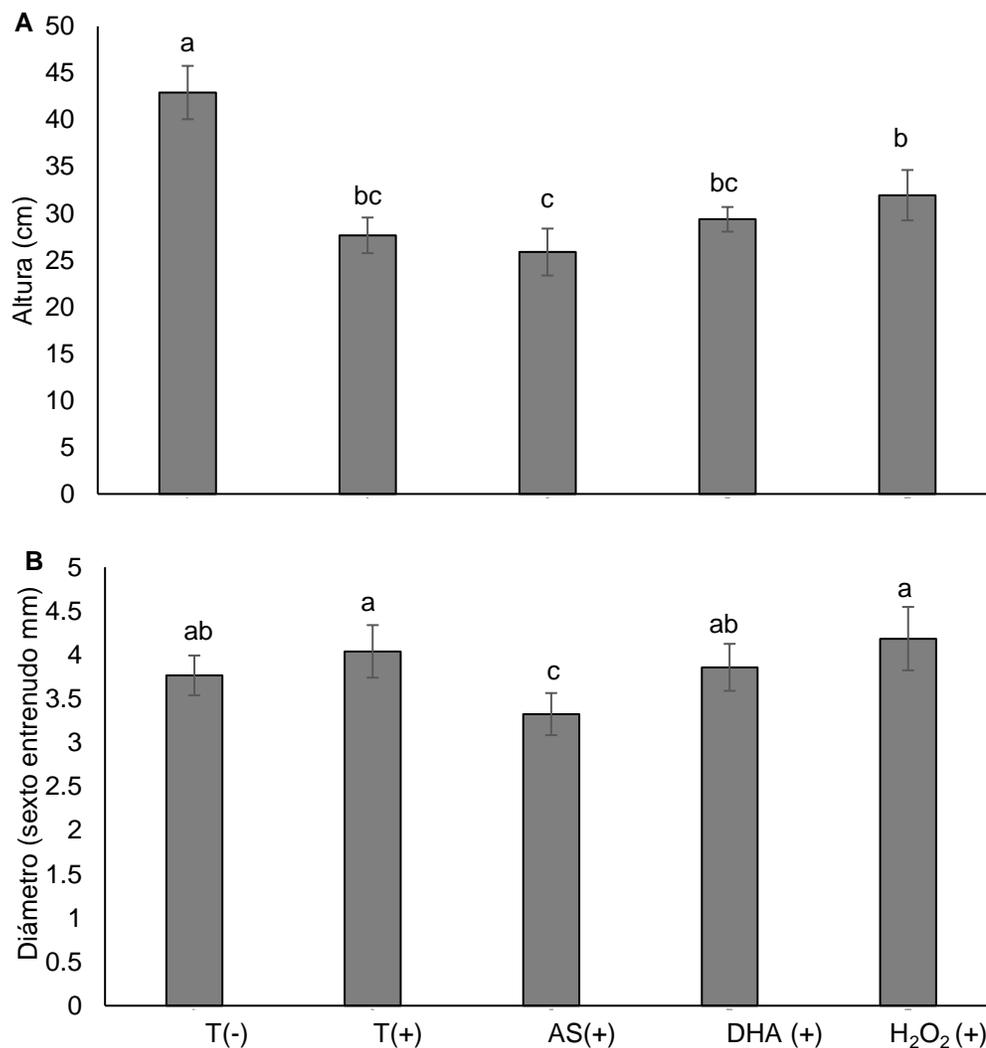


Figura 12. Altura de la planta (A) y diámetro del sexto entrenudo (B) en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y pretratadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=15. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

#### **7.2.1.6. Efecto del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la brotación, peso y número de minitubérculos**

Las plantas pretratadas con AS incrementaron el número de minitubérculos similar al de las plantas testigo no infectadas; mientras que las plantas infectadas y tratadas con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redujeron el número de minitubérculos en contraste con los obtenidos de las plantas no infectadas (Figura 13A). Los pretratamientos con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente el peso de los minitubérculos en contraste con los obtenidos de plantas enfermas con *Ca. Liberibacter* (Figura 13B). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue el tratamiento que indujo un mayor número de brotes con respecto a las plantas testigo infectadas y no infectadas (Figura 13C).

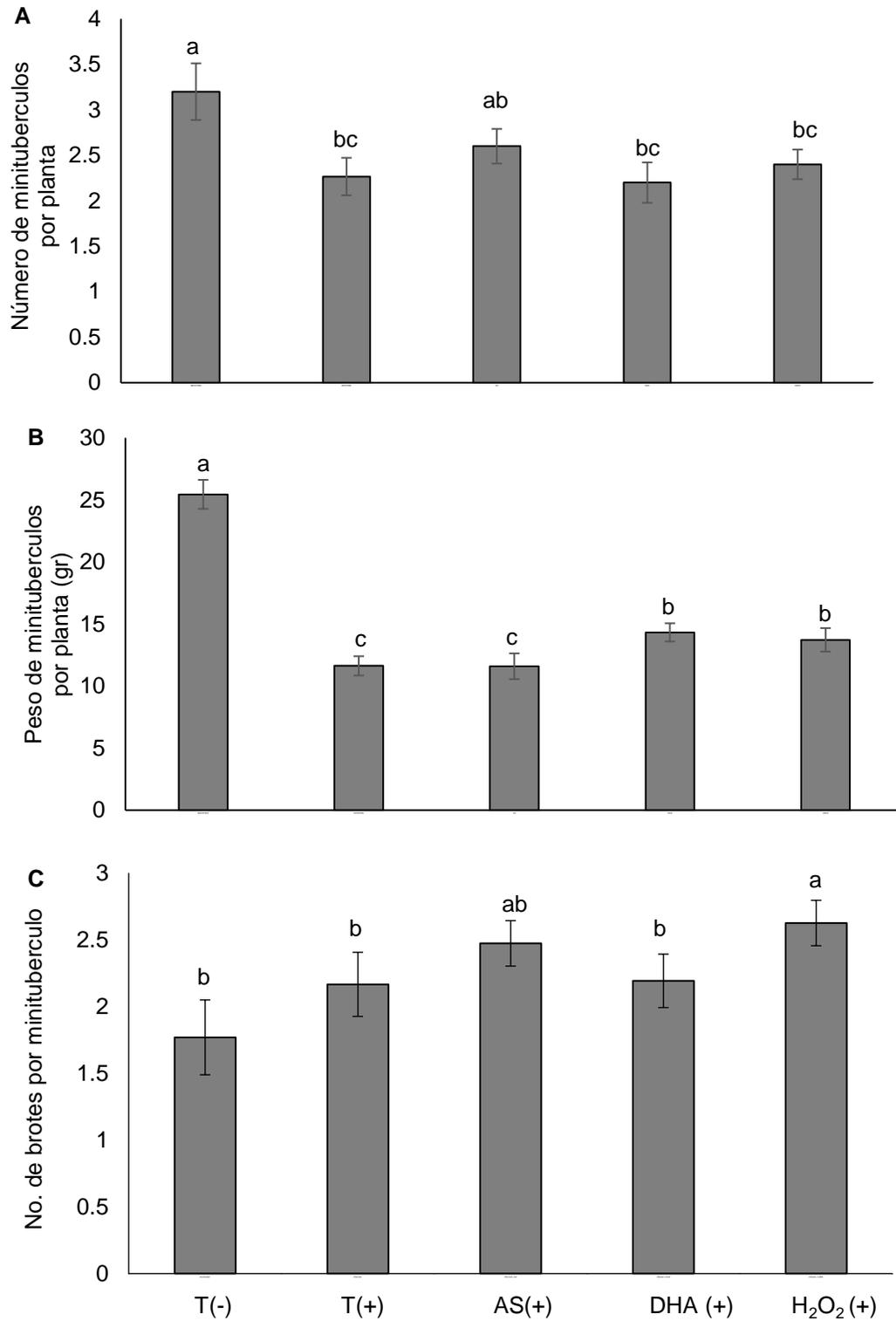


Figura 13. Número (A) y peso (B) de minitubérculos, número de brotes (C) en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y pretratadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

## **7.2.2. Efecto a corto plazo (aspersión con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

### **7.2.2.1. Actividad enzimática de POX, CAT y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

En las plantas testigo no infectadas, se observó un incremento significativo de la actividad enzimática de la POX en comparación con las plantas testigo infectadas por la bacteria (Figura 14A). Ninguno de los tratamientos incrementó la actividad enzimática de POX en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* con respecto a las plantas testigo no infectadas. En las plantas testigo no infectadas, la actividad enzimática de CAT se incrementó significativamente con respecto a las plantas testigo infectadas con la bacteria (Figura 14B). El tratamiento con SA no incrementó la actividad de la enzima; sin embargo, los tratamientos con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente la actividad de la CAT con respecto a las plantas testigos infectadas. El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó de manera significativa la actividad de la CAT con respecto a todos los tratamientos incluyendo las plantas testigo no infectadas (Figura 14A). La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementó en las plantas testigo infectadas con *Ca. Liberibacter* comparado con el de las plantas testigo no infectadas (Figura 14C). El tratamiento con DHA fue el que incrementó de manera significativa el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a todos los tratamientos (Figura 14C).

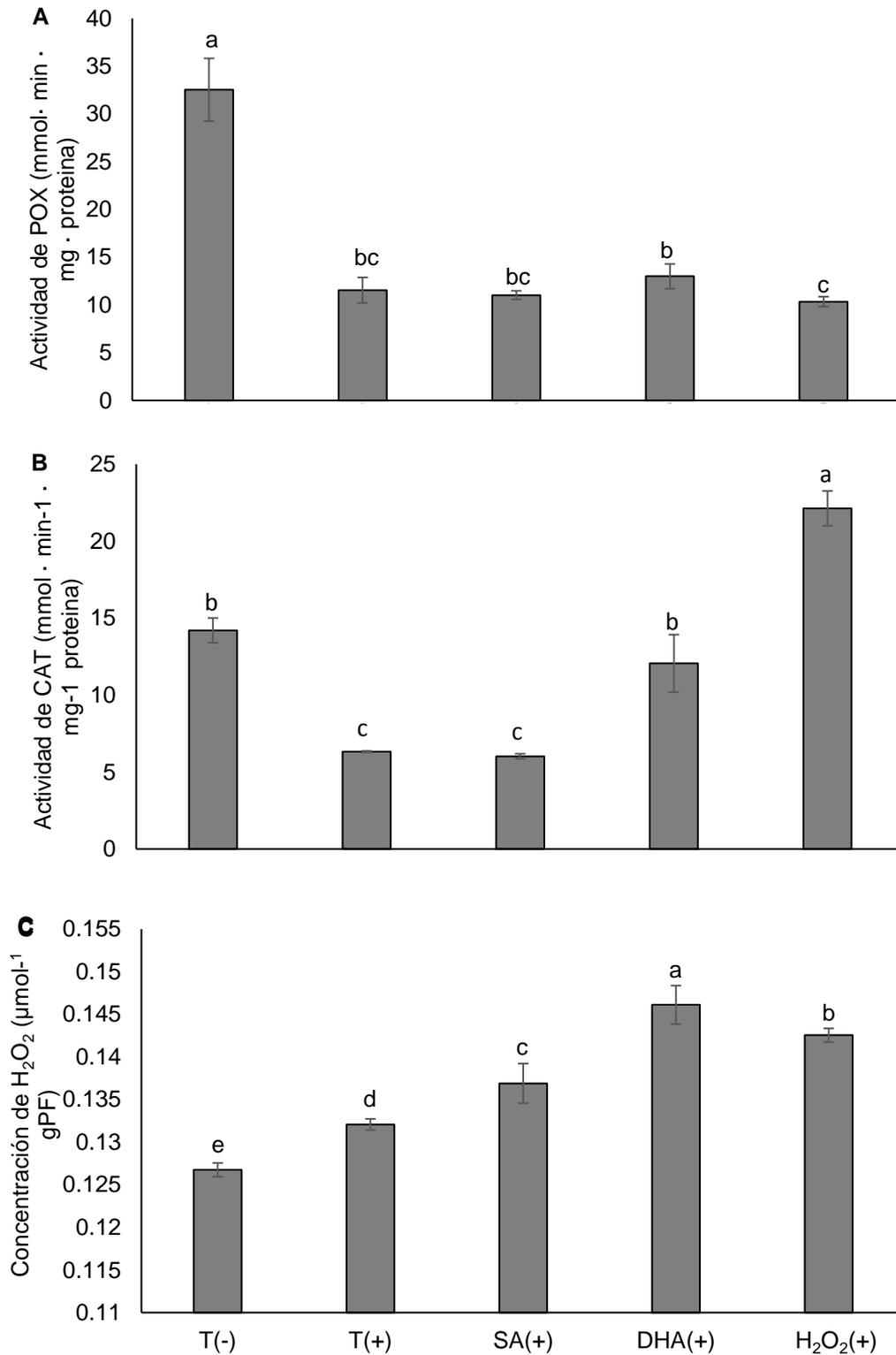


Figura 14. Actividad de POX (A), CAT (B) y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y asperjadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Datos son promedios ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

### 7.2.2.2. Actividad de la calosa sintetasa y deposición de calosa

No se observaron cambios significativos en la actividad de la calosa sintetasa en las plantas infectadas y asperjadas con las moléculas señal y testigos (Figura 15A, B). Sin embargo si se puede observar, una intensidad ligeramente mayor en las bandas de la actividad de la calosa sintetasa con los tratamientos de DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 15A, B). También se observó una deposición de calosa en todos los tratamientos de manera uniforme (Figura 16).

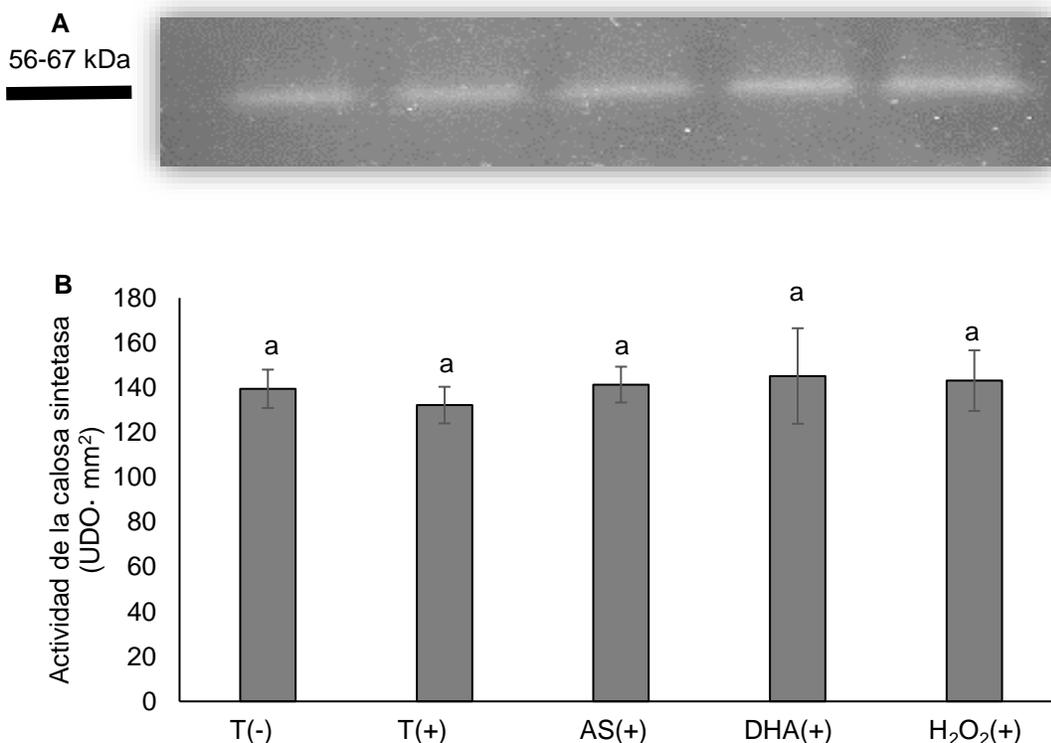


Figura 15. Gel nativo de actividad (A), actividad de calosa sintetasa (B) densidad óptica de las bandas por tratamiento de plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y asperjadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA. ± ES, n=9. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

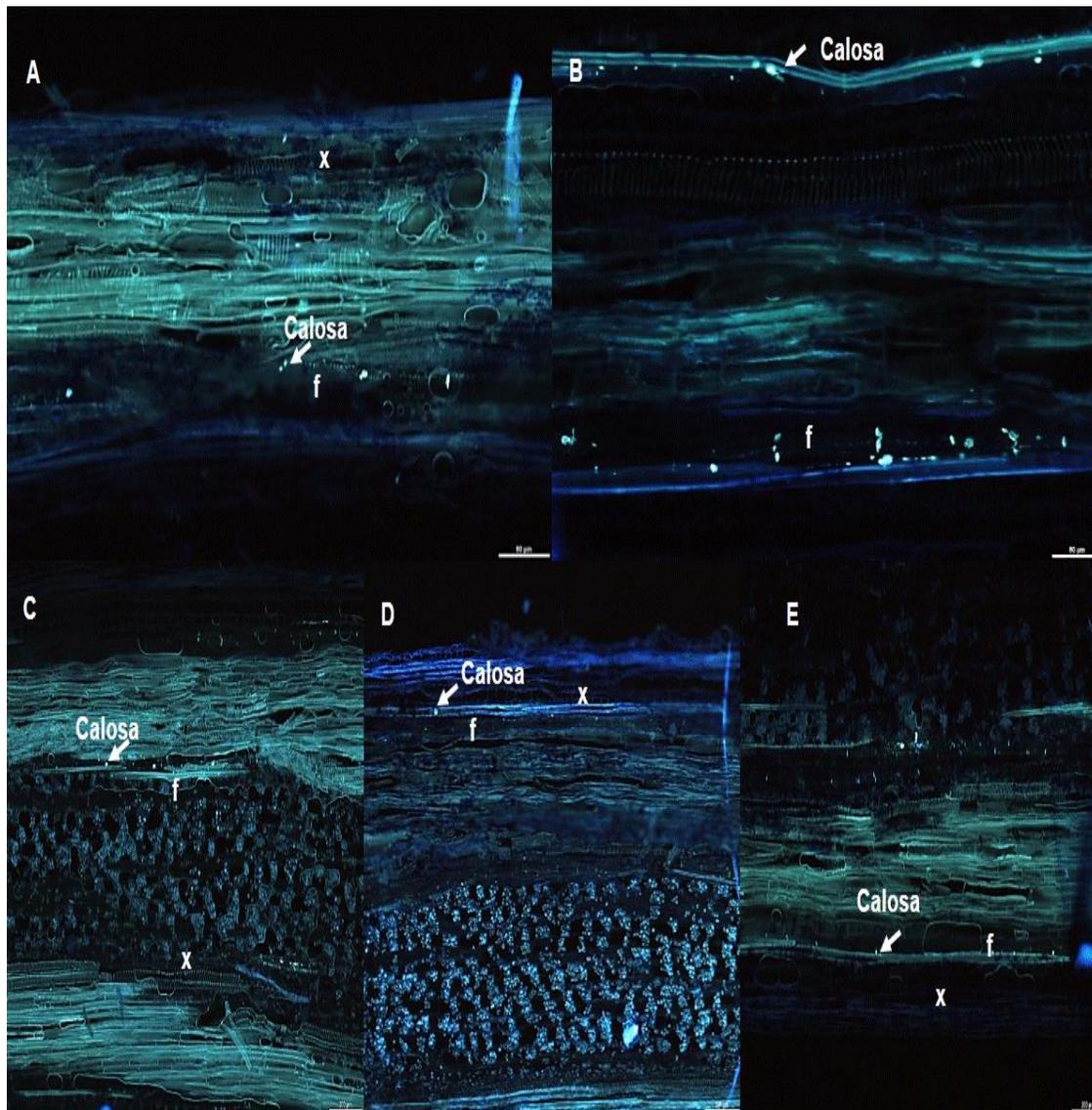


Figura 16. Efecto de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHA en la acumulación de calosa en plantas sanas(A),infectadas (B), asperjadas con AS (C), DHA (D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E). Floema del Sistema vascular (f), xilema (x). Barra = 80µm.

### 7.2.2.3. Potencial hídrico ( $\Psi_A$ ) y conductancia estomática (gs)

Las plantas no infectadas con el patógeno presentaron significativamente un menor  $\Psi_A$  comparado con el de las plantas infectadas por *Ca. Liberibacter* (Cuadro 2). Interesantemente, los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no incrementaron

significativamente el  $\Psi_A$  en las plantas infectadas. El tratamiento con DHA redujo significativamente el  $\Psi_A$  a valores similares a los de las plantas testigo sanas. No se observó un efecto a corto plazo en la conductancia estomática y el contenido relativo de clorofila por efecto de los tratamientos con AS, DHA y  $H_2O_2$  (Cuadro 2) en las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter*; sin embargo, si se observó una reducción significativa en la  $g_s$  en las plantas tratadas con  $H_2O_2$  en contraste con las plantas no infectadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto a corto plazo del AS, DHA y  $H_2O_2$  en algunos parámetros asociados a fotosíntesis en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* a los 73 DDT en condiciones de invernadero. Datos son de 3 experimentos  $n=15 \pm ES$ .

Tratamiento	Potencial hídrico (MPa)	Conductancia estomática ( $mmoles\ m^{-2}s^{-1}$ )	Contenido relativo de clorofila (unidad SPAD)
Plantas sanas	$-0.48 \pm 0.02a$	$753.28 \pm 49.56a$	$33.22 \pm 1.35a$
Plantas enfermas	$-0.37 \pm 0.03b$	$653.61 \pm 39.67ab$	$30.25 \pm 2.02a$
Plantas enfermas + AS	$-0.43 \pm 0.03ab$	$638.19 \pm 45.1ab$	$30.53 \pm 2.21a$
Plantas enfermas + DHA	$-0.50 \pm 0.02a$	$692.22 \pm 30.87ab$	$28.54 \pm 1.78a$
Plantas enfermas + $H_2O_2$	$-0.40 \pm 0.03ab$	$606.70 \pm 38.05b$	$30.82 \pm 2.05a$

Diferentes letras denotan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

#### 7.2.2.4. Efecto del AS, DHA y $H_2O_2$ en el peso fresco y seco de las plantas

El AS y el  $H_2O_2$  incrementaron significativamente el peso fresco de las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* con respecto a las plantas testigo positivas y negativas. Interesantemente el DHA no incrementó el peso, observándose valores similares al testigo positivo (Figura 17A). Resultados similares al peso fresco fueron observados con el peso seco. El AS y el  $H_2O_2$  incrementaron significativamente el peso seco con respecto a las plantas infectadas y no infectadas (Figura 17B).

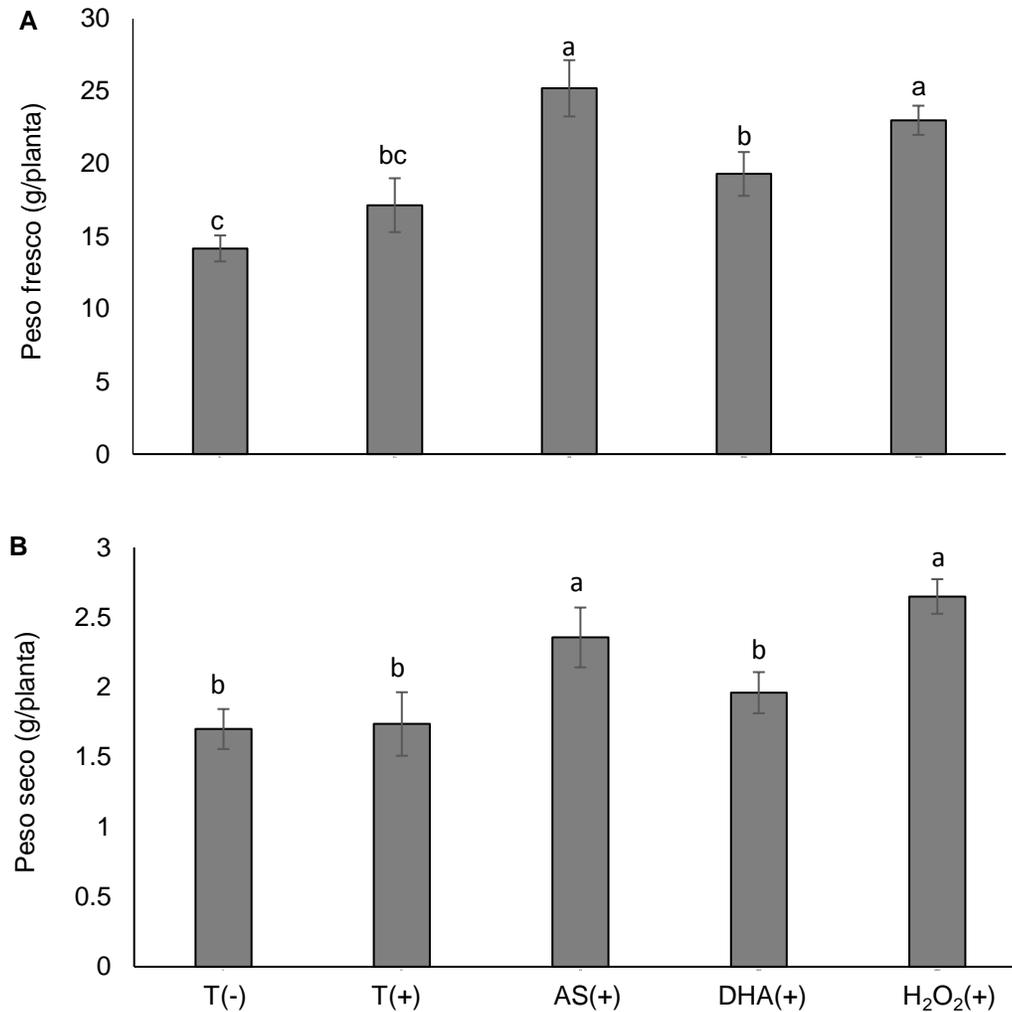


Figura 17. Peso fresco (A), peso seco (B) de plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y asperjadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ± ES, n=15. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

#### 7.2.2.5. Efecto del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la altura y el diámetro del tallo

Las plantas testigo positivas redujeron la altura del tallo por efecto del patógeno. Sin embargo, el AS y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo incrementaron, observándose diferencias significativas con respecto a las plantas testigos infectadas (Figura 18A). Las plantas positivas testigo presentaron un diámetro significativamente mayor con respecto a todos los tratamientos (Figura 18B). Sin embargo las tres moléculas señal (AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) redujeron el diámetro del sexto entrenudo a valores similares a los del testigo negativo (Figura 18B).

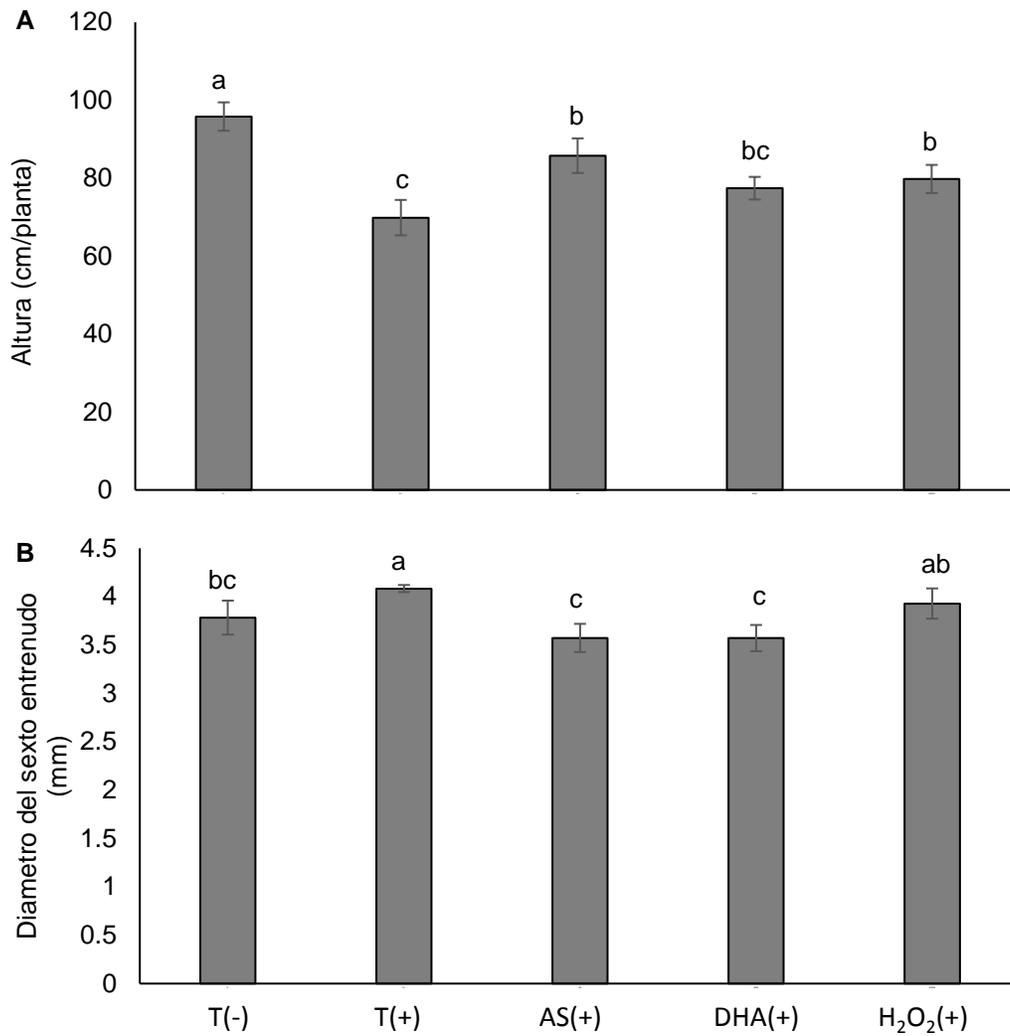


Figura 18. Altura del tallo (A), diámetro del sexto entrenudo (B) en plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y asperjadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

#### **7.2.2.6. Efecto del AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la brotación, peso y número de minitubérculos**

Las plantas positivas testigo produjeron significativamente menos tubérculos que las plantas testigo negativas (Figura 19A). Los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron aunque no de manera significativa el número de minitubérculos (Figura 19A). Interesantemente el efecto de las moléculas señal fue observado en el peso de los minitubérculos incrementando significativamente el peso con respecto al testigo positivo (Figura 19B). También se observó que la infección por el patógeno incrementó de manera significativa la inducción de brotes (Figura 19C); sin embargo el tratamiento con DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó de manera significativa el número de brotes (Figura 19C) respecto al control negativo y positivo.

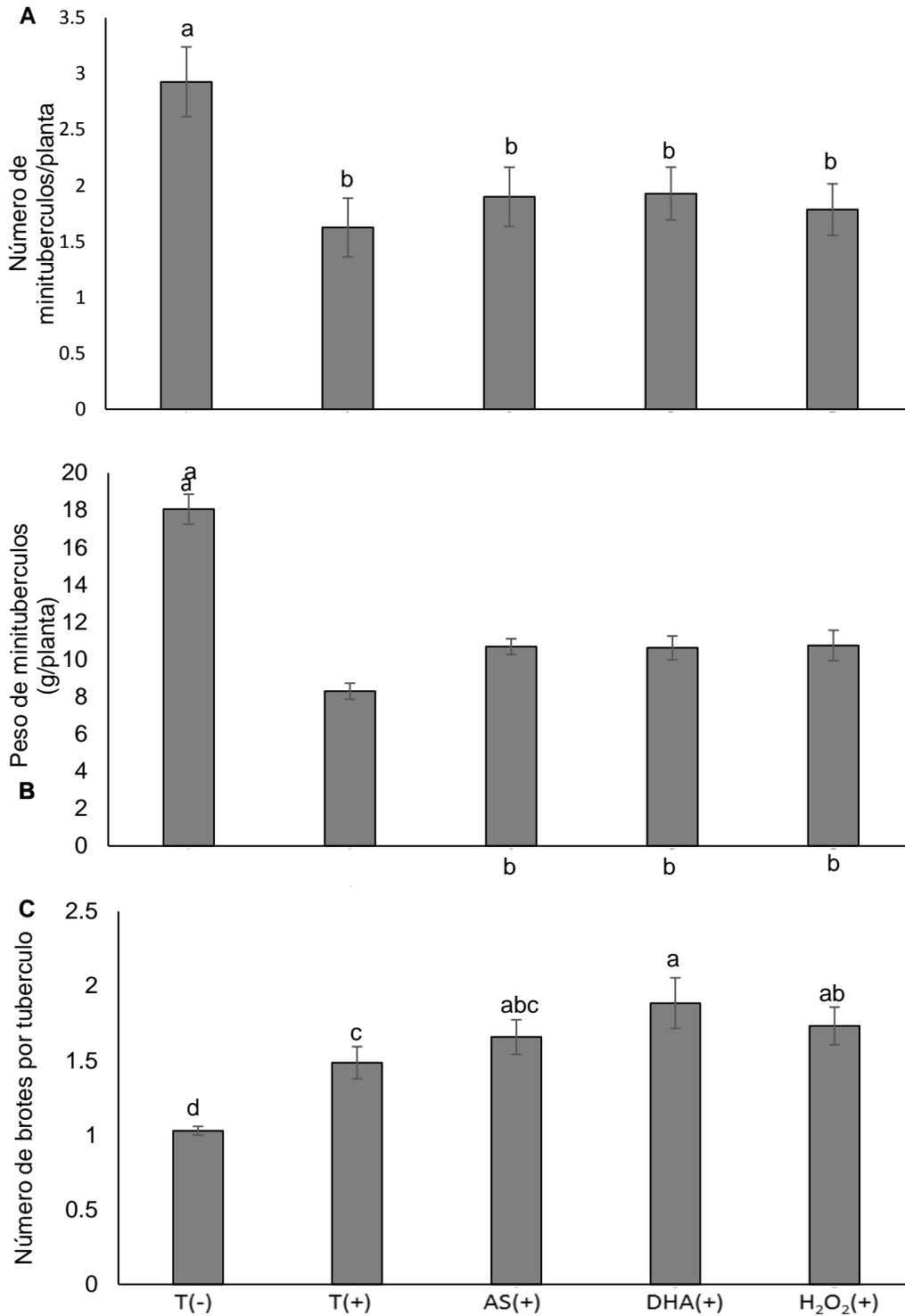


Figura 19. Número (A), peso (B) de minitubérculos y número de brotes por minitubérculo (C) de plantas no infectadas, infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* y asperjadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ± ES, n=30. Barras con diferente letra denotan diferencia significativa.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Etapa 1: Experimentos *in vitro*

Las vitroplantas infectadas con *Ca. Liberibacter*, presentaron cambios significativos a nivel de actividad de enzimas antioxidantes, concentración de  $H_2O_2$ , actividad de la calosa sintetasa que probablemente mediaron la acumulación de calosa en los tubos cribosos. En este trabajo se determinó que las vitroplantas infectadas por la bacteria, presentaron cambios diferenciales con respecto a las plantas no infectadas, reduciendo significativamente la actividad de la CAT (Figura 1A) y de calosa sintetasa (Figura 2A, B) mientras que un incremento significativo en la acumulación interna de  $H_2O_2$  y actividad de la POX fue observado en comparación con las vitroplantas no infectadas (Figura 1B, C). Hasta la fecha no se han encontrados trabajos que demuestren el efecto que tiene *Ca. Liberibacter* en los cambios en enzimas antioxidantes en papa. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los encontrados en *Ca. roseaus* en condiciones de *in vitro* e infectadas por fitoplasma (Leljack-Levanić *et al.*, 2010). Estos autores reportaron que los fitoplasmas redujeron significativamente la actividad de la CAT. La actividad de la CAT puede ser inhibida por el AS acumulado, probablemente sintetizado como mecanismo de defensa por la infección de *Ca. Liberibacter*, la reducción en la actividad de la CAT incrementó la concentración del  $H_2O_2$  (Figura 1C) lo que le permitió actuar como segundo mensajero en la defensa de las plantas contra el estrés inducido por la bacteria (Klessig *et al.*, 2000).

La alta concentración de  $H_2O_2$  encontrada en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* (Figura 4C) podría ser un factor endógeno que impide la diseminación y

replicación de *Ca. Liberibacter* en la planta, inhibiendo al patógeno o bien mediante la generación de ERO como el  $H_2O_2$ , moléculas que podrían tener un efecto antimicrobiano como ha sido demostrado en el dosel de árboles de manzana infectados por fitoplasma (Musetti *et al.*, 2004). El  $H_2O_2$  ha demostrado promover tolerancia contra el estrés abiótico mediante la regulación de enzimas antioxidantes como ocurre en el estrés por sal (Larkindale y Huang, 2004), estrés por calor (Gao *et al.*, 2010), así como por estrés hídrico, sugiriendo que el  $H_2O_2$  incrementa el sistema antioxidante siendo el primer mecanismo de protección contra el estrés ambiental (Bian y Jian, 2009). Los tratamientos con  $H_2O_2$  y DHA promovieron un incremento de la actividad de POX y CAT (Figura 4A, B) en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* en condiciones *in vitro* a los 30 días del tratamiento; este incremento pudo favorecer una reducción en la concentración del patógeno. Se encontró una correlación negativa entre la actividad de CAT y concentración de  $H_2O_2$  en vitroplantas tratadas con SA, DHA  $H_2O_2$ . El tratamiento con  $H_2O_2$  incrementó significativamente la concentración de  $H_2O_2$  en plantas infectadas con respecto al control.

*Ca. Liberibacter solanacearum* podría estar bloqueando los mecanismos estructurales de defensa de las plantas de papa, evitando la síntesis y deposición de calosa (Figuras 5A, B; 6), como se ha observado en estudios previos con bacterias fitopatógenas. Estas investigaciones, demostraron la virulencia de numerosas bacterias patogénicas incluyendo *R. solanacearum*, *Erwinia amilovora*, *Erwinia stewartii*, y *X. campestris*; estas bacterias producen polímeros de exopolisacáridos en la planta (Vojnov *et al.*, 2001; Yun *et al.*, 2006). En estudios con *X. campestris pv Vesicatoria*, Keshavarzi *et al.* (2004) observaron que la bacteria tipo silvestre suprime alteraciones de la pared celular, incluyendo la deposición de calosa, que constituye la forma basal de

resistencia para evitar la colonización de la bacteria. Se ha demostrado que *P. syringae* inhibe la expresión de un grupo de genes en *A. thaliana* que codifican putativamente la síntesis de calosa y proteínas de defensa dependientes de la ruta del AS (Hauck *et al.*, 2003). La expresión transgénica de un gen de avirulencia *AvrPto* reprime un grupo similar de genes en *Arabidopsis*, comprometiendo los mecanismos de defensa como la deposición de calosa en la pared celular, permitiendo la multiplicación sustancial de la bacteria (Hauck *et al.*, 2003).

*Ca. Liberibacter* parece ser una bacteria agresiva su patogenicidad podría estar dada por el gen que posee que codifica para una enzima NahG-salicilato hidroxilasa, esta enzima impide la acumulación de AS en las plantas; el AS se reduce a catecol por la actividad de la enzima, reprimiendo la respuesta sistémica adquirida (SAR), reduciendo los mecanismos de defensa tanto moleculares como estructurales entre ellos la deposición de calosa en los tubos cribosos, incrementando la susceptibilidad de las plantas a los virus y bacterias como lo sugiere Lin y Gudmestad (2013). Otras investigaciones también proponen una correlación positiva entre la infección y la deposición de calosa en *Ca. roseus* (Leljack-Levanić *et al.*, 2010); sin embargo en este trabajo se observaron condiciones contrarias, se obtuvo una reducción en la deposición de calosa en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* (Figura 3). En estudios previos en vitroplantas infectadas con fitoplasma y con diferentes reguladores de crecimiento como tratamientos se observó una mayor deposición de calosa en comparación con las vitroplantas sanas Leljack-Levanić *et al.* (2010).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó la actividad de la enzima calosa sintetasa en gel nativo en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* en contraste con las plantas infectadas control, igualando la actividad encontrada en las plantas (Figura 2A, B). Poco se sabe sobre la

asociación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la deposición de calosa. Luna *et al.* (2011) encontró que la acumulación de calosa estaba asociada con la producción de ROS, especialmente con la alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando las plantas fueron sometidas a estrés por luz, resultados similares fueron obtenidos en esta investigación cuando vitroplantas infectadas son tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron la actividad de la calosa sintetasa y la deposición de calosa (Figuras 5A, B, 6). Contrariamente, las vitroplantas tratadas con AS redujeron tanto la actividad de la calosa sintetasa como la deposición de calosa (Figuras 5A, B, 6). Basados en estudios con elicitores bacterianos, varias vías de biosíntesis y deposición de calosa se han identificado que dependen a su vez de la producción de ROS (Luna *et al.*, 2011) y AS (Nishimura *et al.*, 2003) o indol-glucosinolatos (Geng *et al.*, 2012). Sin embargo, un análisis preciso del papel del gen *GSL5* en la resistencia basal a bacterias patogénicas, se sustenta al hecho ocurrido cuando mutantes de este gen promueven una hiperproducción de ácido salicílico, así como una constitutiva expresión de genes relacionados a la defensa (Nishimura *et al.*, 2003). Tradicionalmente se pensaba, que la deposición de calosa era un mecanismo exclusivo para reforzar la pared celular y permanecer allí como respuesta de defensa; sin embargo, la calosa inducida por patógenos podría regular negativamente los mecanismos de señalización del AS; se ha demostrado, que en mutantes resistentes al hongo *Blumeria graminis* (*pmr4*) carentes del gen inductor de calosa, incrementan la señal del AS, resultando en mayor resistencia al patógeno mediante otros mecanismos de defensa (Nishimura *et al.*, 2003).

Los tratamientos con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron significativamente el peso fresco de las plantas, longitud del tallo y el contenido relativo de clorofila de las vitroplantas en comparación con las vitroplantas infectadas (Figura 7A, B, C); estas

moléculas señal, tuvieron efectos fisiológicos en estos parámetros como lo han demostrado otras investigaciones. Estudios previos, demostraron que el AS en plántulas de trigo asperjadas con 50 mM de AS, desarrollaron liguas con mayor área, también se observó un incremento en la división celular en el meristemo apical de la raíz (Shakirova *et al.*, 2003). Se sugiere, que los efectos en el crecimiento de las plantas podrían ser debido a que el AS promueve cambios en la síntesis de reguladores del crecimiento como las auxinas (Munné-Bosch, 2009). El ácido ascórbico participa en la síntesis de proteínas (entrecruzamiento) de la pared celular lo que podría asociarse con la elongación (altura) y un incremento en peso de la planta; mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la acumulación de almidón y lignina en plantas de papa como lo observaron López-Delgado *et al.* (2005). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también participa en la síntesis de lignanos que son los precursores de la lignina como fue demostrado en *Euterpe oleracea* (Chin *et al.*, 2008). Las moléculas señal participan en la síntesis de pigmentos clorofílicos (Davei *et al.*, 2000), quienes reportaron que el AA participó en la síntesis de pigmentos, debido a que el AA es un cofactor de la violaxantina deepoxidasa que participa en el ciclo de síntesis de xantofilas como pigmentos de protección contra la fotooxidación; también se determinó que mutantes carente del gen *vtc1* que es el gen que codifica para la síntesis del ascorbato mostraron que perdían rápidamente pigmentos clorofílicos, RuBisCO y tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> como lo observó Barth *et al.*, (2004).

## 8.2. Etapa 2 y 3: Experimentos de invernadero

### 8.2.1. Etapa 2: Efecto a largo plazo (pretratamientos con SA, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Estudios previos, han demostrado el efecto a corto plazo que tienen moléculas señal como el DHA y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reducción de síntomas asociados a la incidencia de fitoplasma en plantas de papa (Romero-Romero y López-Delgado, 2009; Sánchez-Rojo, *et al*, 2011). Hoy en día existen pocos estudios con aplicación de compuestos exógenos que reduzcan los síntomas por infección o la concentración del inóculo de *Ca. Liberibacter solanacearum* en las plantas. Habiendo dicho lo anterior, en este estudio se demostró un efecto a largo plazo de las moléculas señal SA, DHA y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reducción de síntomas del SPMP en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* mediado por cambios en la actividad de enzimas antioxidantes y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que podrían coadyuvar a las plantas a promover diferentes mecanismos de defensa contra este estrés biótico.

Algunas de las características del SPMP son la reducción significativa en la altura del tallo, así como un incremento en el grosor (Munyanza, 2007). En este trabajo de investigación, se observó en las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* una reducción significativa de la altura de la planta (Figura 12A). Resultados similares fueron encontrados por Romero-Romero y López-Delgado, (2009); Sánchez-Rojo *et al.* (2011), estos autores observaron una reducción significativa en plantas de papa enfermas con *Ca. fitoplasma*. Interesantemente, en este estudio no se observaron cambios significativos en la biomasa fresca y seca de plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* respecto a las plantas sanas como fue encontrado por Romero-Romero y López-Delgado, (2009) en plantas infectadas con *Ca. fitoplasma*. Dicha respuesta podría estar

asociada al genotipo de papa estudiado, a las condiciones ambientales y a la naturaleza fitopatógena de la bacteria.

El tratamiento a largo plazo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó significativamente la altura del tallo, peso fresco y seco en comparación con las plantas control infectadas (Figura 11A, B). Romero-Romero y López-Delgado (2009) encontraron que estas variables se incrementaron significativamente en plantas infectadas con *Ca. fitoplasma* y asperjadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También se ha demostrado, en trabajos recientes el efecto que tiene esta molécula señal en el incremento de la productividad, como un pretratamiento en las semillas de trigo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreció la tolerancia de las plántulas al estrés por salinidad, reduciendo el daño por estrés oxidativo mediante la expresión de proteínas de estrés (Wuahid *et al.*, 2007), Ahmad *et al.* (2014), demostraron que una aplicación primaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en semillas de maíz, aceleró la germinación, favoreció el crecimiento de las plántulas, incrementaron su peso fresco y seco similar a los resultados encontrados en este trabajo en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* y tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* presentaron una reducción significativa en el número y el peso fresco de minitubérculos producidos (Figura 13A, B). Inesperadamente, las plantas con SPMP asociadas *Ca. Liberibacter* promovieron una reducción significativa en el número y peso fresco de los minitubérculos producidos, contrario a lo observado en estudios previos en plantas infectadas con *Ca. fitoplasma* (Romero-Romero y López-Delgado, 2009; Sánchez-Rojo, *et al.* 2011; Martínez-Gutiérrez *et al.* 2012).

*Ca. fitoplasma* induce un incremento significativo en el número de minitubérculos (Romero-Romero y López-Delgado, 2009); sin embargo, en este trabajo *Ca. Liberibacter solanacearum* no solo indujo una reducción en el número de

minitubérculos, también promovió una reducción en el peso fresco similar a lo reportado por Munyaneza *et al.* (2007); también se ha demostrado que *Ca. Liberibacter* puede inducir la pérdida de peso fresco en los minitubérculos pero no el número (Rashed *et al.*, 2014) en plantas infectadas.

En este estudio, se observó una reducción en el peso y número de minitubérculos en plantas infectadas por *Ca. Liberibacter*, que podría estar asociado con la disminución significativa del contenido relativo de clorofila (64%) en plantas enfermas; así como, una reducción significativa de la *gs* como fue observado (Cuadro 1). También se sugiere una posible reducción en el contenido de proteína y una necrosis en los estolones, que podría estar afectando la producción de minitubérculos en plantas infectadas (Munyaneza, 2012). Otra posible explicación en la pérdida del peso fresco de los minitubérculos podría estar asociada a la obstrucción de los tubos cribosos (Christensen *et al.*, 2004; 2005) por parte del patógeno, interviniendo en el metabolismo de los carbohidratos (Junqueira *et al.*, 2004; Hren *et al.*, 2009) y por lo tanto, promoviendo una reducción de los fotoasimilados hacia los minitubérculos. En esta investigación, no se determinó una obstrucción de los tubos cribosos por acumulación de calosa como se observó en las micrografías (Figura 10), por lo tanto, los síntomas de Zebra chip, no estuvieron asociados al taponamiento de los tubos cribosos; sin embargo, podrían estar asociados a otros mecanismos, como alguna toxina secretada por la bacteria.

Las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* presentaron un alto  $\Psi_A$  y una reducción en la *gs* en comparación con las plantas testigos no infectadas (Cuadro 1). Los resultados obtenidos en esta investigación no concuerdan con los observados por León *et al.* (1996); Martínez-Gutiérrez *et al.* (2012); estos autores reportaron que *Ca.*

*fitoplasma* indujo una reducción en el potencial hídrico en *Cocos nucifera* y *Solanum tuberosum*. En este estudio, se observó una reducción significativa de la *gs* (Cuadro 1) similar a los resultados reportados por Maust *et al.* (2003), asociando la reducción en *gs* a la aparición de síntomas de la infección por *Ca. fitoplasma*, un incremento en la concentración de ABA y una caída en los pigmentos fotosintéticos.

El efecto a largo plazo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promovió en las plantas infectadas un incremento en el peso de minitubérculos (Figura 13B) asociado con un incremento significativo del contenido relativo de clorofila, potencial hídrico y una reducción significativa de la *gs* (Cuadro 1). En este trabajo se observó que plantas infectadas y pretratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvieron un potencial hídrico alto. Resultados similares fueron encontrados por Martínez-Gutiérrez *et al.* (2012) quienes reportaron que plantas infectadas con *Ca. fitoplasma* y asperjadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementaron su potencial hídrico en condiciones de estrés hídrico. Se esperaría, que *Ca. Liberibacter solanacearum* y alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estarían induciendo un incremento en la concentración de ABA en las plantas infectadas, similar a lo que se ha reportado en plantas infectadas con fitoplasmas como ha sido sugerido por León *et al.* (1996), promoviendo que las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* reduzcan la *gs* por el cierre estomático y por consiguiente se mantuvieran altos potenciales de agua comparado con las plantas no infectadas. Es bien conocido que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per se induce estrés (Dat *et al.*, 2000) y promueve la acumulación de ABA en los estomas. La reducción en la *gs* podría estar asociada con un efecto sinérgico entre el patógeno y el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang *et al.*, 2001).

La infección por *Ca. Liberibacter* en plantas de papa promovió un incremento significativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interno (Figura 10E), similar a lo reportado por Martínez-Gutiérrez

*et al.* (2012) en plantas de papa infectadas por *Ca. fitoplasma*. Una sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó en plantas de damasco y vid infectadas con fitoplasma, los autores hipotetizan que el decremento en los antioxidantes (scavengers), más que un incremento podría ser la causa del incremento en la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Musetti *et al.*, 2005; 2007). En este trabajo se confirmó que *Ca. Liberibacter* indujo una reducción de la actividad de CAT como se observó en condiciones *in vitro*, observándose también un incremento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similar a lo observado por Martínez-Gutiérrez *et al.* (2012). El efecto a largo plazo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó la actividad de CAT observándose también una reducción en el contenido interno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas infectadas con respecto a las plantas no infectadas (Figura 8B).

El pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó la biomasa fresca y seca de las plantas; estos resultados pudieron estar asociados con un aumento en la actividad de la enzima anhidrasa carbónica, esta enzima facilita el abastecimiento de CO<sub>2</sub> a la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa regulando la *gs*, incrementando la fijación de CO<sub>2</sub> (Hasan *et al.*, 2016) reflejándose en un incremento en el peso fresco y seco de la planta (Figura 11A, B).

El efecto a largo plazo por el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó en plantas infectadas mediante un incremento significativo del contenido relativo de clorofila y un elevado potencial hídrico, promoviendo un incremento en el peso fresco de minitubérculos similarmente a los estudios previos realizados en plantas de papa infectadas con *Ca. fitoplasma* realizados por Romero-Romero y López-Delgado, (2009); Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012. El incremento en el peso de los minitubérculos producidos por plantas infectadas y pretratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también pudo haber estado asociado a una acumulación de almidón como fue observado por Romero-Romero y

López-Delgado 2009; Martínez-Gutiérrez *et al.* (2012) cuando asperjaron de manera exógena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sin embargo, en este trabajo hubo un efecto a largo plazo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula señal reduciendo los síntomas asociados a la infección por *Ca. Liberibacter*. Se ha demostrado el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el incremento de almidón y fotoasimilados como lo reporta Osaki *et al.* (2009), quienes demostraron que la aplicación exógena de este compuesto incrementó la actividad fotosintética en plantas de melón; también es conocido que induce acumulación de biomasa y azúcares. Estos efectos podrían atribuirse a una mayor tasa de fijación de CO<sub>2</sub> asociada a un incremento en la actividad de las enzimas fructuosa 1-6-bifosfato cloroplástica (*cp-FBPase*) que está asociada en la regeneración de la RuBisCO en el ciclo Calvin-Benson, las actividades de estas enzimas son estimuladas por luz y dependientes en las concentraciones de iones o el potencial redox. Se sabe que otras enzimas importantes en la síntesis de azúcares como la sacarosa fosfato sintetasa (SPS) son inducidas a nivel transcripcional por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Osaki *et al.*, 2009), lo que facilitaría una mayor síntesis de almidón en las plantas de papa infectadas con *Ca. Liberibacter* aumentando también la biomasa fresca y seca en plantas.

El pretratamiento con DHA tuvo un efecto a largo plazo, incrementó significativamente el peso de los minitubérculos, asociado con un incremento en el contenido relativo de clorofila, alto  $\Psi_A$  y *gs* (Cuadro 1); sin embargo, en el peso fresco y seco de la planta no presento efectos significativos con respecto a los de las plantas testigo infectadas (Figura 11A, B), resultados similares fueron observados por Romero-Romero y López-Delgado (2009) en plantas infectadas con fitoplasma y asperjadas con DHA. El ácido ascórbico participa en la síntesis de compuestos clorofílicos (clorofila a, b y xantofilas y carotenoides), debido a que es un cofactor de la violaxantina deepoxidasa

que participa en el ciclo de síntesis de xantofilas como pigmentos de protección contra la fotooxidación (Davey *et al.*, 2000). El ácido ascórbico también está involucrado en la síntesis de tocoferoles y carotenoides (Noctor y Foyer, 1998), sugiriendo en este trabajo, una asociación con el incremento de clorofila en plantas infectadas y tratadas con DHA.

Similarmente a lo encontrado con el pretratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas infectadas por *Ca. Liberibacter*, el pretratamiento con DHA incrementó significativamente el peso fresco de minitubérculos con respecto a los minitubérculos producidos por las plantas testigos infectadas con la bacteria. El efecto del DHA a largo plazo podría estar involucrado en la formación de ATP en el estroma del cloroplasto, incrementando la eficiencia de la fijación del CO<sub>2</sub> en el ciclo de Calvin Benson como fue determinado por Forti y Elli (1995), reflejándose en un incremento en el peso de los minitubérculos. El DHA participa activamente en los procesos de envejecimiento, regulando los genes asociados a senescencia (SAG's). Los SAG's son inducidos por un incremento en la síntesis de ABA que podrían estar asociados con el patógeno (*Ca. Liberibacter*), induciendo la degradación de pigmentos fotosintéticos, de RuBisCO y por lo tanto la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>. El ácido ascórbico es un cofactor para síntesis de ácido giberélico (AG) que retarda los efectos de los SAG's induciendo la síntesis de pigmentos, por lo tanto su aplicación exógena podría estar incrementando la síntesis de AG y tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, reflejándose en un incremento en el peso de minitubérculos. Se sabe que mutantes carentes del gen *vtc1* que es el gen que codifica para la síntesis del ascorbato perdieron rápidamente pigmentos clorofílicos, RuBisCO y redujeron la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (Barth *et al.*, 2004).

El efecto a largo plazo del pretratamiento con DHA, promovió un incremento significativo en la actividad de CAT (Figura 8B), similar al efecto del pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas infectadas. Se ha demostrado, que *Ca. Liberibacter* reduce la acumulación de AS en la planta inhibiendo los mecanismo de defensa mediante los antioxidantes y SAR; sin embargo, la aplicación exógena de ácido ascórbico en plantas deficientes de AS promovió una reducción en síntomas por virosis, incrementando la actividad de enzimas como CAT, SOD y APX, induciendo mayor sobrevivencia en las plántulas de *Arabidopsis* y de tabaco (Wang *et al.*, 2011). En este trabajo, las plantas tratadas con DHA incrementaron significativamente la actividad enzimática de CAT y redujeron la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 8B, C) reflejándose en un incremento en el peso fresco del minitubérculo y contenido relativo de clorofila.

Estudios previos, han demostrado el efecto a largo plazo del tratamiento con AA; pretratamientos en semillas de dos variedades de coliflor en condiciones de estrés hídrico y cultivadas en invernadero, redujeron la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incrementaron la actividad de enzimas antioxidantes, el peso seco y fresco, el contenido relativo de agua en las hojas, la permeabilidad de la membrana, así como también incrementaron la acumulación de compuestos fenólicos (Latif *et al.*, 2016).

En este trabajo no se observó un incremento en la actividad de calosa sintetasa (Figura 9A, B); en plantas infectadas y tratadas con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sin embargo, se observa una mayor intensidad en la banda con los tratamientos (Figura 9A) con los tratamientos con respecto a la banda obtenida de las plantas sanas. Se esperaría que la infección con *Ca. Liberibacter solanacearum* incrementaría la acumulación de calosa en tubos cribosos o bien el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se ha sugerido por Koh *et al.* (2012), quienes reportaron mayor acumulación de calosa en tubos cribosos por efecto

de *Ca. Liberibacter asiaticus* en *Citrus xparadisi*. Es necesaria la implementación de técnicas más precisas como la inmunolocalización que ayuden a determinar la acumulación de calosa de manera cuantitativa y no cualitativa. En este trabajo se observó una acumulación de calosa en todos los tratamientos incluyendo en las plantas testigos infectadas y no infectadas (Figura 10). Existen estudios que demuestran como algunos patógenos son capaces de suprimir los mecanismos de defensa de las plantas, entre ellos la acumulación de calosa. Un ejemplo de ello es *Xantomonas campestri* causante de la necrosis de raíz de diferentes crucíferas (Yun *et al.* 2006). Esta bacteria produce un amplio espectro de enzimas hidrolíticas como son proteasas, glucanasas y endoglucanasas; también produce un polisacárido extracelular conocido como xantano que son esenciales para inducir patogenicidad. La acumulación de calosa inhibe el crecimiento y dispersión del patógeno en la planta, el xantano está involucrado en la supresión de este mecanismo de defensa. La supresión de los mecanismos de defensa, como la deposición de calosa, tienen un papel fundamental en las enfermedades de las plantas (Nomura *et al.*, 2005). Los xantanos producidos por *Xantomonas campestri*, inhiben la deposición de calosa en el mesófilo de la hoja en estadios tempranos de infección (Newman *et al.*, 1994), también se ha observado, una alta producción de este polisacárido en los estadios finales de infección patogénica principalmente en el tejido necrótico (Vojnov *et al.*, 2001). *Ralstonia solanacearum* presenta mecanismos similares a los de *X. campestri* cuando infecta *Solanum lycopersicum* (Kang *et al.*, 1999). La producción de polímeros de xantano por bacterias fitopatógenas ha sido implicado en varios síntomas, incluyendo el marchitamiento por bacterias localizadas en el sistema vascular y exudados foliares producto de altas concentraciones bacterianas (Denny, 1995).

### 8.2.2. Etapa 3: Efecto a corto plazo (aspersión con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Pocos son los estudios realizados sobre el efecto de *Ca. Liberibacter* en el sistema antioxidante y oxidativo en plantas de papa (Alvarado *et al.*, 2012). En este trabajo determinamos que la actividad de las enzimas antioxidantes POX y CAT redujeron significativamente; mientras que un incremento significativo en la concentración H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue observado en plantas infectadas con respecto a las plantas sanas; (Figura 14A, B, C), los resultados encontrados en esta investigación, distan con los reportados por otros autores. Kumar *et al.* (2017) observaron un incremento significativo en la actividad de POX, CAT, SOD en tubérculos de papa infectados con *Ca. Liberibacter*. Sin embargo, un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes fue observado asociado a un incremento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los contrastes entre los resultados obtenidos por Kumar *et al.* (2017) y los observados en esta investigación podrían deberse a las diferencias fisiológicas entre el tubérculo y la hoja; sin embargo, el incremento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tallo y tubérculo fue observado en las dos investigaciones. En este trabajo se determinó que *Ca. Liberibacter* incrementó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduciendo la actividad de las enzimas antioxidantes. Los cambios metabólicos son importantes para mediar el estrés oxidativo en las plantas infectadas, para mantener el potencial redox a nivel celular y prevenir el daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos cambios a nivel de antioxidantes y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proveen información; las plantas de papa están sufriendo estrés oxidativo promovido por *Ca. Liberibacter*. El superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son potentes agentes microbianos producidos por el hospedero como un mecanismo de defensa contra los patógenos (Torres *et al.*, 2013); en respuesta a la

infección las plantas generan un estallido inmediato de radicales superóxido producidos durante la respiración celular, la enzima que se encarga de reducir la concentración de los radicales es conocida como NADPH oxidasa (NOX), en tubérculos sanos es muy baja o detectada su actividad, sin embargo en tubérculos enfermos se observó un incremento significativo en la actividad de esta enzima (Kumar *et al.*, 2017).

La acumulación de  $H_2O_2$  es un factor endógeno que impide la diseminación y replicación de patógenos en las hojas, inhibiendo a la bacteria como *Ca. Liberibacter* o bien mediante la generación de ERO, moléculas que podrían tener un efecto antimicrobiano como ha sido demostrado en el dosel de árboles de manzana infectados por fitoplasma (Musetti *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el  $H_2O_2$  promovió tolerancia contra el estrés abiótico mediando la regulación de enzimas antioxidantes como ocurre en el estrés por salinidad (Larkindale y Huang, 2004), estrés por calor (Gao *et al.*, 2010), así como por estrés hídrico, sugiriendo que el  $H_2O_2$  incrementa el sistema antioxidante siendo el primer mecanismo de protección contra el estrés ambiental (Bian y Jian, 2009). Se ha demostrado que el  $H_2O_2$  incrementó el contenido de clorofila en plantas infectadas por fitoplasma resultando en un aumento en el peso y el contenido de almidón de los minitubérculos (López-Delgado *et al.*, 2005; Romero-Romero y López-Delgado, 2009). El tratamiento con DHA y  $H_2O_2$  promovieron un incremento de la actividad de CAT en plantas infectadas a los 73 DDT, (Figura 14B), este incremento pudo favorecer efectos positivos sobre los minitubérculos infectados. La actividad de CAT en plantas tratadas con DHA fue similar a la de las plantas sanas; sin embargo, un incremento significativo se observó en las plantas tratadas con  $H_2O_2$  correlacionándose positivamente con concentración de  $H_2O_2$  (Figura 14B, C). Los tratamientos con AS, DHA y  $H_2O_2$  incrementaron significativamente la concentración de  $H_2O_2$  en plantas

infectadas con respecto a las plantas testigos infectados. Tales diferencias en la concentración de  $H_2O_2$  sugieren el papel del AS, DHA y  $H_2O_2$  como molécula señal que induce efectos significativos en los minitubérculos infectados por *Ca. Liberibacter*, tales efectos son el incremento del peso y número de brotes (Figura 19B, C). La acumulación de  $H_2O_2$  podría ser un factor detonante en el incremento del número de brotes en minitubérculos provenientes de plantas asperjadas con DHA y  $H_2O_2$  como lo han demostrado Bajji *et al.* (2007). Estos autores, estudiaron la ruptura de la dormancia aplicando un tratamiento con tiourea (químico inhibidor de la actividad de CAT) observando una ruptura de la dormancia y aceleración la brotación (Bajji *et al.*, 2007). La represión de la actividad de CAT aceleró la brotación y fue asociada con un incremento en la concentración de  $H_2O_2$  (M'Hamdi *et al.*, 2014). Diferentes respuestas en la actividad de CAT se han observado por aplicaciones exógenas de AS, DHA y  $H_2O_2$  en plantas de papa bajo diferentes condiciones de cultivo, tales como plantas infectadas con fitoplasma en condiciones de invernadero (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012) plantas *in vitro* (Mora-Herrera *et al.*, 2005) y plantas infectadas con fitoplasma en condiciones de campo (Romero-Romero, 2009).

La literatura ha documentado una relación compleja de señalización entre el AS y el  $H_2O_2$ ; el AS puede incrementar a el  $H_2O_2$  (Dat *et al.*, 2000) pero también puede ser inducido por el  $H_2O_2$  (Chamngopol *et al.*, 1996). El AS se ha reportado como un inhibidor de la actividad de CAT en plantas de papa (López-Delgado *et al.*, 1998; Mora-Herrera *et al.*, 2005). Las respuestas inducidas por estas moléculas señal en la brotación del tubérculo, podrían estar asociadas a los mecanismos sugeridos por M'Hamdi *et al.* (2014), en donde una inactivación de la CAT podría conducir a un incremento en la actividad de la APX, por lo tanto estos cambios desencadenarían la

activación del ciclo glutatión y pentosas fosfatos y subsecuentemente en un incremento en la ruptura de la dormancia. Los efectos por la aspersión de con estas moléculas sobre la actividad de CAT y acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tubérculos son de gran interés para futuras investigaciones.

En este trabajo se demostró que el AS, DHA y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son moléculas señalizadoras a corto plazo, debido a que incrementaron tanto el peso fresco y el peso seco de las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter* (Figura 17A, B). Se ha demostrado que el AS incrementa la productividad, el área foliar y el peso de minitubérculos en plantas de papa infectadas con *Ca. fitoplasma* en plantas como lo reportó Sánchez-Rojo *et al.* (2011). Así mismo los resultados en este trabajo concuerdan con los de Romero-Romero y López-Delgado (2009); Martínez-Gutiérrez *et al.* (2012), quienes demostraron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un incremento en el peso y el contenido de almidón de los minitubérculos. Recientemente se ha probado el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHA y AS en la disminución de los síntomas a fitoplasma (Romero-Romero y López-Delgado, 2009; Sánchez-Rojo *et al.*, 2011) y en la tolerancia a estrés hídrico en plantas de papa infectadas con fitoplasma (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012), asociados con un incremento de la actividad antioxidante y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando en un incremento de la productividad y calidad del tubérculo.

Las respuestas en la inducción de tolerancia a estrés encontradas en esta investigación, son muy importantes en los programas de manejo integrado de cultivos y en el sistema de producción de semilla “*in vitro*-invernadero-campo”, debido a que son potencialmente aplicables a todos los cultivos para favorecer a variedades sensibles a estrés que tienen características agronómicas importantes.

En este trabajo se determinó que hubo una reducción en el  $\Psi_A$  en las plantas infectadas con la bacteria y tratadas con DHA con respecto a las plantas testigo no infectadas (Cuadro 2). Estos resultados fueron similares a los obtenidos a largo plazo por efecto del DHA. Mientras que los tratamientos con AS y  $H_2O_2$  no tuvieron efecto en cambios significativos en el  $\Psi_A$ . El  $H_2O_2$  redujo la conductancia estomática (Cuadro 2) con respecto a las plantas no infectadas testigo. Es bien conocido que el  $H_2O_2$  *per se* induce estrés (Dat *et al.*, 2000) y promueve la acumulación de ABA en los estomas. La reducción en la *gs* podría estar asociada con un efecto sinérgico entre el patógeno y el tratamiento con  $H_2O_2$  (Zhang *et al.*, 2001) como ya se ha mencionado en el efecto a largo plazo del  $H_2O_2$ .

## 9. CONCLUSIONES

- ❖ En este estudio se demostró el efecto a corto y largo plazo de las moléculas señal SA, DHA y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reducción de síntomas del SPMP en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum* mediado por cambios en la actividad de enzimas antioxidantes y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que podrían coadyuvar a las plantas a promover diferentes mecanismos de defensa contra este estrés biótico.
- ❖ *Ca. Liberibacter solanacearum*, modificó el potencial hídrico y la conductancia estomática mediados por una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ❖ Los engrosamientos en los tallos de las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter*, no son debidos a la acumulación en la deposición de calosa; debido a que se determinó que la actividad de calosa sintetasa se redujo así como la deposición de calosa en plantas *in vitro* enfermas.
- ❖ *Ca. Liberibacter* promovió cambios diferenciales a nivel de enzimas antioxidantes, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actividad de la calosa sintetasa y deposición de calosa en las vitroplantas infectadas.
- ❖ Las vitroplantas infectadas con *Ca. Liberibacter*, presentaron cambios significativos a nivel de actividad de enzimas antioxidantes, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actividad de la calosa sintetasa y por lo tanto influyó en la acumulación de calosa en los tubos cribosos.
- ❖ Se observó una reducción significativa de la actividad de CAT; mientras que un incremento significativo en la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actividad de POX fue observada en las vitroplantas infectadas en comparación con las vitroplantas no infectadas.
- ❖ El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó la actividad de la calosa sintetasa y en la acumulación de calosa en los tubos cribosos de las vitroplantas enfermas.

- ❖ El AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tienen un efecto a largo plazo en plantas enfermas en condiciones de invernadero, reduciendo significativamente los síntomas de SPMP asociados a *Ca. Liberibacter*, incrementando la productividad y contenido relativo de clorofila.
- ❖ La conductancia estomática se modificó por efecto de la aplicación a largo plazo del DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reflejándose en un incremento del peso fresco de los minitubérculos.
- ❖ Los tratamientos a corto plazo con AS, DHA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atenuaron los síntomas del SPMP asociados con *Ca. Liberibacter*, incrementando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad de CAT y favoreciendo el peso de los minitubérculos
- ❖ El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un incremento del número de brotes tanto a largo plazo como a corto, mediados por el incremento en la concentración interna de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siendo este un beneficio más para el productor.
- ❖ No se observó manchado del tubérculo en ninguno de los tratamientos ni en los provenientes de plantas infectadas.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abad JA, Bandla M, French-Monar RD, Liefting LW, Clover GRG. 2009. First report of the detection of '*Candidatus Liberibacter*' species in zebra chip disease-infected potato plants in the United States. *Plant Disease*. 93: 108.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- Agami RA. 2014. Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biologia Plantarum*. 58: 341-347.
- Ahmad L, Khaliq T, Ahmad A, Shahzad M, Basra A, Hasnain Z, Ali A. 2012. Effect of seed priming with ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide on emergence, vigor and antioxidant activities of maize. *African Journal of Biotechnology*. 11: 1127-1132.
- Akram NA, Shafiq F, Ashraf M (2017) Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Sciences*. 8: 613.
- Alami-Milani M, Aghaei-Gharachorlou P. 2015. Effect of ascorbic acid application on yield and yield components of lentil (*Lens culinaris* Medik.) under salinity stress. *International Journal of Bioscience*. 6: 43-49.
- Alami-Milani M, Aghaei-Gharachorlou P. 2015. Effect of ascorbic acid application on yield and yield components of lentil (*Lens culinaris* Medik.) under salinity stress. *International Journal of Biosciences*. 6: 43-49.
- Almeyda LIH, Rocha PMA, Piña RJ, Martínez SJP. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19: 1-9.

- Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez JA, Nicolás G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Nicolás C. 2009. Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*. 150: 1335-1344.
- Ananieva EA, Alexieva VS, Popova LP. 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 159: 685-693.
- Anderson MD, Prasad TK and Stewart CR. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. 109:1247-1257.
- Antoniw J, White FRR. 1980. The effect of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco, *Phytopathologische Zeitschrift*. 98: 331 341.
- Ashraf MA, Hussain RR, Iqbal IM, Haider,M.Z, Parveen,S. 2015. Hydrogen peroxide modulates antioxidant system and nutrient relation in maize (*Zeamays* L.) under water-deficit conditions. *Archives of Agronomy in Soil Science*. 61: 507-523.
- Bajji M, M'Hamdi M, Gastiny F, Rojas-Beltran JA, Du Jardin P. 2007. Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*. 11: 121-131.
- Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL. 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. *Plant Physiology*. 134: 1784-1792.

- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J. 2013. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany*. 65: 527-538.
- Bian S, Jiang Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*. 120: 264-270.
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7-37.
- Buchman LJ, Venkatesan G, Munyaneza EJ. 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. *Journal of Economic Entomology*. 104(5): 1486-1495.
- Cadena HMA, Guzmán PR, Díaz VM, Zavala QTE, Magaña TOS, Almeyda LIH, López DH, Rivera PA, Rubio CO. 2003. Distribución, incidencia, y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 248-259.
- Cadena-Hinojosa MA. 1993. La Punta Morada de la Papa en México: Incidencia y búsqueda de resistencia. *Agrociencia*. 4: 247-256.
- Cadena-Hinojosa MA. 1999. Potato Purple Top in México: Effects of plant spacing and insecticide application. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17(2): 91-95.
- Chamnongpol S, Willekens H, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Camp WV. 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and

- induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant Journal*. 10: 491-503.
- Chin Y-W, Chai H-B, Keller WJ, Kinghorn AD. 2008. Lignans and others constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with antioxidant and cytoprotective activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 7759-7764.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 17: 1175-1184.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A. 2005. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 17: 1175-1184.
- D'Arcy WG. 1973. Solanaceae, en: *Flora of Panama*, *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 60: 573-780.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Montaung MV, Inzé D, Breusegem VF. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*. 57: 779-795.
- Davey MW, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 80: 825-860.
- Deblonde P, Haverkort A, Ledent JF. 1999. Responses of early and late potato cultivars to moderate drought conditions: agronomic parameters and carbon isotope discrimination. *European Journal of Agronomy*. 14: 31-41.

- Espinoza NO, Estrada R, Silva-Rodríguez D, Tovar P, Lizarraga R, Dodds JH. 1986. The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture*. 15:21-26.
- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*. 41: 281-284.
- Fatemi SN. 2014. Ascorbic acid it's effects on alleviation of salt stress in sunflower. *Annual Researche & Review in Biology*. 4: 3656-3665.
- Fatima U, Senthil-Kumar M. 2017. Tissue water status and bacterial pathogen infection: How they are correlated?. In: Senthil-Kumar M. (eds) *Plant tolerance to Individual and concurrent Stresses*. Springer, New Delhi.
- Forti G, Elli G. 1995. The Function of Ascorbic Acid in Photosynthetic Phosphorylation. *Plant Physiology*. 109(4): 1207-1211.
- Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 119: 355-364
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28: 1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 155: 2-18.
- Freeman BC, Beattie GA (2009) Bacterial growth restriction during host resistance to *Pseudomonas syringae* is associated with leaf water loss and localized cessation of vascular activity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22: 857-867.

- Gao Y, Guo S-H, Lin Y-Y, Bai J-G. 2010. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae*. 126: 20-26.
- García-Mata C, Lamattina, L. 2013. Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant Science*. 201: 66-73.
- Geng X, Cheng J, Gangadharan A, Mackey D. 2012. The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of *Arabidopsis* defense. *Plant Cell*. 24: 4763-4774.
- Gillespie KM, Ainsworth EA. 2007. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Natural Protocols*. 2:871-874.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- González A, de los Ángeles Cabrera M, Henríquez MJ, Contreras RA, Morales B, Moenne A. 2012. Crosstalk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess. *Plant Physiology*. 158:1451-1462.
- Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R, Paine TD. 2008. A New Huanglongbing Species, "*Candidatus Liberibacter psyllaureus*", Found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 5862-5865.

- Hasan AS, Irfan M, Masrahi YS, Khalaf AM, Hayat S. 2016. Growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Vigna unguiculata* L. treated with hydrogen peroxide. *Cogent Food Agriculture*. 2: 1155331.
- Hauck P, Thilmony R, He SY. 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. 100: 8577-8582.
- Hren M, Nikolic P, Roter A, Blejec A, Terrier N, Ravnikar M, Dermastia M, Gruden K. 2009. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*. 10: 460.
- Hung SH, Yu CW, Lin CH. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botany Bulletin Academic Sinica*. 46:1-10.
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB. 2003. An *Arabidopsis* callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell*. 15: 2503-2513.
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 379-386.
- Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, Veisz O, Páldi E. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*. 164: 301-306.
- Junqueira A, Bedendo I, Pascholati S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiology and Molecular Plant Pathology*. 65: 181-185.

- Kang Y, Saile E, Schell MA, Denny TP. 1999. Quantitative immunofluorescence of regulated eps gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 2356-2362.
- Kerk NM, Feldman LJ. 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development*. 121: 2825-2833.
- Keshavarzi M, Soylu S, Brown I, Bonas U, Nicole M, Rossiter J, Mansfield J. 2004. Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 17: 805-815.
- Kim YJ, Lee YH, Lee HJ, Jung H, Hong JK. 2015. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and gene expression of antioxidant enzymes in kimchi cabbage (*Brassica rapa* var. *glabra* Regel) seedlings regulated by plant development and nitrosative stress-triggered cell death. *Plant Biotechnology Report*. 9: 67-78.
- Kingston-Smith AH, Harbinson J, Foyer CH. 1999. Acclimation of photosynthesis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents and antioxidants in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures. *Plant, Cell and Environment*. 22: 1071-1083.
- Koh E-J., Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan Y-P, Kang B-H. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "Candidatus Liberibacter asiaticus". *Protoplasma*. 249: 687-697.
- Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology*. 165: 920-931.

- Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl, H. 2012. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials* 33: 5177-5186.
- Kumar GNM, Knowles LO, Knowles NR. 2017. Zebra chip disease enhances respiration and oxidative stress of potato tubers (*Solanum tuberosum*) *Planta* 246: 625-639.
- Larkindale J, Huang B. 2004. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology*. 161: 405-413.
- Latif M, Akram AN, Ashraf M. 2016. Regulation of some biochemical attributes in drought-stressed cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by seed pre-treatment with ascorbic acid. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 91: 129-137.
- Lee IM, Bottner KD, Munyaneza JE, Secor GA, Gudmestad NC. 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 Disease*. 88: 429.
- Leljak-Levanic D, Jezic M, Cesar V, Ludwig-Muller J, Lepedus H. 2010. Biochemical and epigenetic changes in phytoplasma-recovered periwinkle after indole-3-butyric acid treatment. *Journal Applied Microbiology*. 109: 2069-2078.
- León R, Santamaría JM, Alpizar L, Escamilla JA, Oropeza C. 1996. Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytol*. 134: 227-234.

- Li ZG, Luo LJ, Sun YF. 2015. Signal crosstalk between nitric oxide and hydrogen sulfide may be involved in hydrogen peroxide-induced thermotolerance in maize seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*. 62: 507-514.
- Liefting LW, Bevan S, Shaun RR, Gerard CRG. 2009. '*Candidatus* Liberibacter solanacearum', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 2274-2276.
- López-Delgado H, Zavaleta-Mancera HA, Mora-Herrera ME, Vázquez-Rivera M, Flores-Gutiérrez FX, Scott IM. 2005. Hydrogen peroxide increases potato tuber and stem starch content, stem diameter; and stem lignin content. *American Journal of Potato Research*. 82: 279-285.
- López-Delgado H, Dat JF, Foyer CH, Scott IM. 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*. 49: 713-720.
- López-Delgado H, Mora-Herrera ME, Zavaleta-Mancera HA, Cadena-Hinojosa M, Scott IM. 2004. Salicylic acid enhanced heat-tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research*. 81: 161-166.
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24: 183-193.
- M'Hamdi M, Chikh-Rouhou H, Saidi W, Essid F, Bajji M, Du Jardin P. 2014. Effect of genetic modification of catalase activity on the dormancy and the sprouting of potato mini tubers (*Solanum Tuberosum* L.). *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*. 4: 66-71.

- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13: 614-629.
- Maramorosch K. 1998. Current status of potato purple top wilt. *International Journal of Tropical Plant Diseases*. 16: 61-72.
- Martínez-Gutiérrez R, Mora-Herrera ME, López-Delgado HA. 2012. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phytoplasma-infected potato plants promotes antioxidant activity and tuber production under drought conditions. *American Journal of Potato Research*. 89: 53-62.
- Maust BE, Espadas F, Talavera C, Aguilar M, Santamaría JM, Oropeza C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*. 93: 976-981.
- Mayi AA, Ibrahim R, Abdurrahman, A. S. 2014. Effect of foliar spray of humic acid, ascorbic acid, cultivars and their interactions on growth of olive (*Olea europaea* L.) transplants cvs. Khithairy and Sorany. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 7: 18-30.
- Mazid M, Khan TA, Khan ZH, Quddusi S, Mohammad F. 2011. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 1: 167-184.
- Mehler AH. 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysic*. 33: 339-351.
- Melotto M, Underwood W, He SY. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review in Phytopathology*. 46: 101.

- Miller G, Susuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*. 33: 453-467.
- Mora-Herrera ME, López-Delgado H, Castillo-Morales A, Foyer CH. 2005. Salicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiologia Plantarum*. 125: 430-440.
- Mora-Herrera ME, López-Delgado HA. 2007. Freezing tolerance and antioxidant activity in potato microplants induced by abscisic acid treatment. *American Journal of Potato Research*. 84: 467-475.
- Munné-Bosch S, Penñuelas J. 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*. 217: 758-766.
- Munyanaza JE, Crosslin JM, Upton JE. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera:Psyllidae) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United State and Mexico. *Journal of Economic Entomology*. 100:656-663.
- Munyanaza JE, Sengoda VG, Buchman JL, Fisher TW. 2012. Effects of temperature on ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease*. 96:18-23.
- Murugan CA, Thomas J, Rajagopal RJ, Mandal A. 2012. Metabolic responses of tea (*Camellia* sp.) to exogenous application of ascorbic acid. *Journal Crop Science and Biotechnology*. 15: 53-57.
- Musetti R, di Toppi LS, Ermacora P, Favali MA. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: An ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*. 94: 203-208.

- Musetti R, Marabottini R, Badiani M, Martini M, Sanita di Toppi L, Borselli S, Borgo M, Osler R. 2007. On the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera*, cv. Prosecco) from Flavescence doree disease. *Functional Plant Biology*. 34:750-758.
- Navarre DA, Mayo D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 64: 179-188.
- Naz H, Akram NA, Ashraf M. 2016. Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany*. 48: 877-883.
- Newman MA, Conrads-Strauch J, Scofield G, Daniels MJ, Dow JM. 1994. Defense-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 7: 553-563.
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. 2003. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*. 301: 969-972.
- Niu L, Liao W. 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science*. 7: 230.
- Noctor G, Foyer CH. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant cell and environment*. 28: 1056-1071.
- Noctor G, Foyer, CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 249-279.

- Nomura K, Melotto M, He SY. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 361-368.
- Nyathi Y, and Baker A. 2006. Plant peroxisomes as a source of signaling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763: 1478-1495.
- Ozaki K, Uchida A, Takabe T, Shinagawa F, Tanaka Y, Takabe T, Hayashi T, Hattori T, Rai AK, Takabe T. 2009. Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. *Journal Plant Physiology*. 166: 569-578.
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veijovic-Jovanovic S, verrier PJ, Noctor G, Foyer CH. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*. 15: 939-951.
- Petrov VD, van Breusegem F. 2012. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants*. 2012: pls014
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*. 132: 1631:1641.
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*. 141: 910-923.
- Rashed A, Wallis CM, Paetzold L, Workneh F, Rush CM. 2013. Zebra chip disease and potato biochemistry: tuber physiological changes in response to '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' infection over time. *Phytopathology*. 103: 419-426.
- Remans T, Opdenakker K, Smeets K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A. 2010. Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and

- NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Functional Plant Biology*. 37: 532-544.
- Rivas-San Vicente M, Plascencia J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*. 62: 3321-3338.
- Romero-Romero MT, López-Delgado HA. 2009. Ameliorative effects of hydrogen peroxide, ascorbate and dehydroascorbate in *Solanum Tuberosum* infected by phytoplasma. *American Journal of Potato Research*. 86: 218-226.
- Rousselle P, Crosnier JC. 1999. La patata, producción, mejora, plagas y enfermedades, utilización. Versión español J. M. MateoBox. Editores Mundi-Prensa. España. 607 pp.
- Rubio C.O.A *et al.* 2000. Manual para la producción de papa en las sierras y valles altos del centro de México. SAGAR.INIFAP.CIRCE. Campo experimental Valle de Toluca. Libro Técnico No. 1. Zinacantepec, Estado de México.
- Sánchez-Rojo S, López-Delgado HA, Mora-Herrera ME, Almeida-León HI, Zavaleta Mancera HA, Espinoza- Victoria D. 2011. Salicylic acid protects potato plants-from phytoplasma-associated stress and improves tuber photosynthate assimilation. *American Journal of Potato Research*. 88: 175-183.
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 995-1014.
- Scholander PF, Ham mel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*. 148: 339-346.
- Secor GA, Rivera-Varas VV. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Review Latinoamerica Papa 1 (Suppl.)*, 1-8.

- Secor GA, Rivera VV, Abad JA, Lee I-M, Clover GRG. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease*. 93: 574-583.
- Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K. 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*. 30: 157-161.
- Shafiq S, Akram NA, Ashraf M, Arshad A. 2014. Synergistic effects of drought and ascorbic acid on growth, mineral nutrients and oxidative defense system in canola (*Brassica napus* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 36: 1539-1553.
- Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova V, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova DR. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*. 164, 317-322.
- Shi C, Qi C, Ren HY, Huang AX, Hei SM, She XP. 2015. Ethylene mediates brassinosteroid-induced stomatal closure via Ga protein-activated hydrogen peroxide and nitric oxide production in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 82: 280-301.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3(SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant capacity and plays a role in the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 99: 11640-11645.
- Smirnoff N. 2001. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 229-235.

- Song JT. 2006. Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules and Cells*. 22: 233-238.
- Srivastava MK, Dwivedi UN. 1998. Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *Journal of Plant physiology*. 153: 409-414.
- Stone BA, Clarke AE. 1992. Chemistry and physiology of higher plant 1,3- $\beta$ -glucans (callose), in: B.A. Stone, A.E. Clarke (Eds.), *Chemistry and Biology of (1,3)- $\beta$ -Glucans*, La Trobe University Press, Bundoora, pp. 365-429.
- Tanaka FAO, Colleta-Filho HD, Alves KCS, Spinelli MO, Machado MA, Kitajima EW. 2007. Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatoly Brasile*. 36: 519-520.
- Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, Inacio da Costa P, Ayres AJ, Bové J. 2005. ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 55, 1857-1862.
- Torres MA, Morales J, Sánchez-Rodríguez C, Molina A, Dangl JL. 2013. Functional interplay between *Arabidopsis* NADPH oxidases and heterotrimeric G-protein. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 26: 686-694.
- Turner NC. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science*. 9: 289-308.
- Uzunova AN, Popova LP. 2000. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica*. 38: 243-250.
- Valluri JV, Soltes EJ. 1990. Callose formation during wound inoculated reaction of *Pinus elliotii* to *Fusarium subglutinans*. *Phytochemistry*. 29: 71-72.

- Vargas PO, Martínez M, Dávila PA. 2003. La familia *Solanacea* en Jalisco. Primera edición. México. 133pp.
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.
- Voigt CA, Schäfer W, Salomon S. 2006. A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 242-247.
- Vojnov AA, Slater H, Daniels MJ, Dow JM. 2001. Expression of the *gum* operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 14: 768–774
- Walling LL. 2009. Adaptive defense responses to pathogens and pests. *Advances in Botanical Research* 51: 551-612.
- Wallis RL. 1955. Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. *Technology Bulletin US Department of Agriculture*. 1107: 1-24.
- Wang S-D, Zhu F, Yuan S, Yang H, Xu F, Shang J, Xu M-Y, Jia S-D, Zhang Z-W, Wang J-H, Xi D-H, Lin H-H. 2011. The roles of ascorbic acid and glutathione in symptom alleviation to SA-deficient plants infected with RNA viruses. *Planta* 234: 171-181.
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 393: 365-369.
- Wuahid A, Perveen M, Gelani S, Basra SMA. 2007. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal of Plant Physiology*. 164: 283-294.

- Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 98: 6516-6521
- Yun MH, Torres PS, Oirdi M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA. 2006. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology*. 141: 178-187.
- Zhang PJ, Zheng SJ, van Loon JJA, Boland W, David A. 2009. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Science*. 106: 21202-21207.
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 126: 1438-1448.
- Zhou B, Guo Z, Liu Z. 2005. Effects of abscisic acid on antioxidant systems of *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. under chilling stress. *Crop Science*. 45: 599-605.