



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Interacción planta-patógeno				
Título del proyecto:	Genes del tomate involucrados en el establecimiento de la interacción del sistema <i>Bactericera cockerelli-Candidatus Liberibacter solanacearum-Solanum lycopersicum</i>				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	75000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	X	Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable yrodriguezpa@conacyt.mx
Vinculación:	Si	No	X	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo				
A realizar durante el(los) año(s):	2016-2018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza	Parasitología	100067		
Colaborador:	Dra. Yisa María Ochoa Fuentes	Parasitología	3948		
Colaborador:	Dr. Ernesto Cerna Chávez	Parasitología	3563		
Colaborador:	Dr. Jerónimo Landeros Flores	Parasitología	1058		
Colaborador:	Dr. Luis Aguirre Uribe	Parasitología	0899		
Colaborador:	Dra. Susana González Morales	Horticultura	100062		
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Dolores Barranco Valle	Maestría	41071424		
Programa Docente:	Maestría en Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
	Vo. Bo.		Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1 - Titulo del proyecto

Genes del tomate involucrados en el establecimiento de la interacción del sistema <i>Bactericera cockerelli</i> - <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> - <i>Solanum lycopersicum</i>	Presupuesto solicitado: 75,000
---	-----------------------------------

2 - Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la principal hortaliza producida en México, siendo Sinaloa, Michoacán y Zacatecas los tres estados de mayor producción (INEGI, 2011). Tan solo en 2014 se produjeron 2,875,164.08 toneladas con un valor comercial de 15,735,506 33 miles de pesos (SIAP, 2014). Dentro de las enfermedades que limitan su producción se encuentra el permanente del tomate, causado por *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLSol). Además del tomate, CLSol infecta a varias especies de la familia de las solanáceas, como papa (*Solanum tuberosum*), chile (*Capsicum annuum*) tomatillo (*Physalis peruviana*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*), entre otros (EPPO, 2013). La principal forma de dispersión de la bacteria es mediante su vector, el psílido *Bactericera cockerelli*. El complejo bacteria-vector han causado serios daños a la industria de la papa y el tomate en el continente americano (Munyanza *et al.*, 2007; Guenthner *et al.* 2012). En la actualidad, el uso de insecticidas para controlar al vector ha sido el único medio efectivo de controlar la enfermedad (EPPO, 2013) y la búsqueda o desarrollo de plantas tolerantes o resistentes parece ser el mejor mecanismo de control de la bacteria, aunque aún no han sido identificadas plantas con estas características (Munyanza *et al.*, 2011).

El análisis del transcriptoma del tomate al ser atacado por el complejo *B. cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum* es fundamental para identificar los genes clave en el establecimiento de la bacteria, y así poder elucidar modificaciones en el hospedante mediante manipulación genética que deriven en la obtención de una variedad tolerante o resistente a CLSol. Una de las técnicas moleculares más usadas es la generación de bibliotecas sustractivas de ADN complementario (ADNc) por medio de la técnica de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (Hirao *et al.* 2012; Kushwaha *et al.*, 2015; Legay *et al.* 2011). Pero también la identificación y cuantificación de diversos genes mediante qPCR tomando como base lo reportado en literatura.

Objetivos

- Obtener colonias de *Bactericera cockerelli* infectadas y libre de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.
- Determinar el tiempo de inoculación de *Bactericera cockerelli* mínimo necesario para la transmisión de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en tomate.
- Identificar algunos de los cambios generados en el transcriptoma del tomate (*Solanum lycopersicum*) en estadios tempranos del establecimiento del sistema *Bactericera cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum*-tomate mediante la técnica de Hibridación Sustractiva bajo condiciones de Supresión.

Hipótesis

- *Candidatus Liberibacter solanacearum* puede ser eliminado de *Bactericera cockerelli* con el uso de antibiótico.
- Existen genes expresados diferencialmente en tomate durante las primeras horas en que se establece la interacción del sistema *Bactericera cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum*-*Solanum lycopersicum*.

3 -Revisión de Literatura

La respuesta de una planta al ataque de un patógeno o un sistema de patógenos, ya sea que se establezca la enfermedad o no, se da a través de una cascada de señales moleculares en tiempo variable, que va desde un par de minutos hasta varias horas posteriores al inicio del patosistema (Ojito-Ramos y Portal, 2010; Ordeñana, 2002).

Varios autores han realizado investigaciones para determinar tanto el tiempo de adquisición como el de inoculación de CLSol por su vector *B. cockerelli*. Garzón-Tiznado *et al.* (2009) reportan un tiempo de adquisición por el estadio adulto del insecto que va de 30 min a 48 h, mientras que el periodo de inoculación va de 15 min a 24 h. Sengoda *et al.* (2013) reportan que el tiempo de adquisición va de 8 a 72 h mientras que el de inoculación va de 4 a 72h. Sus resultados sugieren que entre mayor sea el tiempo que pasen los psíidos en contacto con las plantas de tomate, mayor será el porcentaje de plantas infectadas por CLSol.

La detección de la bacteria en los tejidos de sus hospedantes se ha realizado mediante PCR en punto final y tiempo real, mostrando que ambas pueden ser técnicas confiables para detectar al patógeno dentro de la planta. Los primeros usados más frecuentemente son los que amplifican el gen 16S del RNA ribosomal (Liefing *et al.* 2009; Gutierrez-Ibañez *et al.* 2013).

La Hibridación Sustractiva bajo condiciones de Supresión (HSS) es una técnica propuesta por Diatchenko *et al.* (1990) y ha sido útil para identificar genes expresados diferencialmente, como lo demuestran diferentes investigaciones (Hirao *et al.* 2012; Kushwaha *et al.*, 2015; Legay *et al.* 2011). Mediante esta técnica, se compara RNA mensajero de dos poblaciones y se obtienen fragmentos de genes que son expresados en una de las poblaciones pero no en la otra. Una de las muestras (de la que se quieren obtener los genes expresados diferencialmente) es denominada como muestra problema, mientras que la otra es denominada muestra control). Tanto el problema como el control son hibridados, y las secuencias híbridas son removidas. Por consecuencia, el cDNA que permanece representa los genes que se expresan en la muestra problema pero que no se encuentra en la muestra control (Diatchenko *et al.*, 1990). Comúnmente, los resultados obtenidos por la técnica de HSS se validan y cuantifican mediante otra técnica molecular, como la RT-qPCR. La PCR en tiempo real ha mostrado ser una metodología robusta y ampliamente utilizada en investigación biológica ya que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Como herramienta de investigación, la principal aplicación de esta tecnología es la rápida y precisa valoración de cambios en la expresión de genes como resultado de la fisiología, la fisiopatología o la evolución. Este método puede ser aplicado a sistemas modelo para medir respuesta a estímulos de tipo experimental y para adentrarse en los cambios potenciales a nivel proteico y funcional. De este modo, la fisiología puede ser correlacionada con eventos moleculares para tener un mejor entendimiento de los procesos biológicos. La cuantificación relativa permite determinar cuántas veces, más o menos, se expresa un gen problema respecto a un gen endógeno de referencia (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Sin embargo, para realizar investigaciones como la presente se necesitan colonias del trióximo libres de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. En la naturaleza, es difícil encontrar a insectos vectores libres de organismos parásitos o simbiontes. Una de las técnicas desarrollada desde hace varios años para eliminar a los organismos endosimbiontes de algunos insectos ha sido la aplicación de antibióticos. El siguiente resume algunas de estas investigaciones:

Antibióticos usados	Hospedante	Endosimbionte eliminado
Ampicilina, tetraciclina, rifampicina	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Candidatus Portiera aleyrodidarum</i> , <i>Wolbachia</i>
Ampicilina, rifampicina	Áfidos	<i>Buchnera</i> , <i>Serratia</i>
Tetraciclina, rifampicina	<i>Folsema candida</i>	<i>Wolbachia</i>
Penicilina, estreptomycinina	Cítricos	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
Ampicilina, carbenicilina, penicilina, cefalexina, rifampicina, sulfadimetoxina	Vástago/brotos de cítricos	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
Tetraciclina	<i>Brugia malayi</i>	<i>Wolbachia</i>
Tetraciclina, rifampicina, clortetraciclina	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Buchnera</i>

Autores como Koga *et al.* (2007), quienes administraron ampicilina y rifampicina a áfidos para eliminar *Serratia* y *Buchnera* de áfidos, recomienda usar dosis de acuerdo al peso de los insectos. Así, para la ampicilina recomiendan de 10 a 1000 ng/mg del áfido y rifampicina de 2 a 20 ng/mg del insecto, con buenos resultados. Hasta el momento, no existen investigaciones sobre la administración de antibióticos a *Bactericera cockerelli* para eliminar a *Candidatus Liberibacter solanacearum* reportadas en la bibliografía.

4.- Procedimiento Experimental

Debido a la dificultad de obtener en la naturaleza colonias del insecto libres de la bacteria, primero se han diseñado las

estrategias para obtener una colonia con esas características.

Obtención de colonias de *Bactericera cockerelli* libres de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Se probarán tres antibióticos reportados en bibliografía como sistémicos, de amplio espectro y que han mostrado ser efectivos para eliminar bacterias gram-negativas de insectos como lo es *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Los antibióticos serán ampicilina, tetraciclina y rifampicina; y se probarán dos métodos aplicación, que es por esqueje y por película residual.

Se partirá de una colonia de *Bactericera cockerelli* que se encuentre infectada por *Candidatus Liberibacter solanacearum* verificada esta infección previamente por PCR en punto final.

Bioensayo 1.

Se trabajara con insectos de *Bactericera cockerelli* en etapa adulta y se realizaran ambos métodos de aplicación de los antibióticos, tanto por esqueje de acuerdo a Pérez - González *et al.* (2017) como por película residual de acuerdo a IRAC. (2017). El montaje del experimento se realizara con plantas de chile morrón sanas (*Capsicum annuum*) para mantener alimentándose a los insectos durante el tiempo del bioensayo.

Para este primer bioensayo se utilizaran los tres antibióticos con cinco dosis correspondientes para cada uno de ellos y 3 repeticiones, con un total de 45 unidades experimentales por método de aplicación. Se evaluara durante el tiempo del bioensayo (7 días) la mortandad del insecto, y al final del bioensayo, se verificará la presencia, ausencia o disminución de la cantidad relativa de bacterias dentro de los insectos mediante PCR y qPCR.

Bioensayo 2.

Se usarán insectos del 4to y 5to instar y solo un método de aplicación de antibiótico, de acuerdo al que haya resultado más efectivo en el bioensayo 1. Nuevamente se utilizaran plantas de chile morrón sanas para mantener a las ninfas alimentándose durante el tiempo del bioensayo. Para este segundo bioensayo se utilizaran los dos antibióticos que resulten más efectivos del primer bioensayo y únicamente tres dosis, con cuatro repeticiones cada una, dando un total de 24 unidades experimentales por etapa ninfal. Se evaluara durante el tiempo del bioensayo (7 días) la mortandad del insecto, y al final del bioensayo, se verificará la presencia, ausencia o disminución de la cantidad relativa de bacterias dentro de los insectos mediante PCR y qPCR.

Bioensayo 3

Se diseñará y probará una estrategia de aplicación de antibióticos usando más de un periodo de alimentación (p.ej. 5 días de administración de antibiótico, 7 de descanso y 5 de administración de antibiótico) y dos etapas del insecto (p.ej. 4to instar y adulto), para obtener una colonia de *Bactericera cockerelli* libre de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, de acuerdo a los resultados de los 2 bioensayos obtenidos anteriormente.

Debido a que la cascada de señales en la planta como respuesta a un estímulo es muy rápida, se realizará un bioensayo previo para determinar el tiempo mínimo necesario de inoculación del insecto para transmitir a CLsol en plantas de tomate.

Determinación del periodo mínimo de inoculación.

Fuente de inóculo

El inóculo a usar de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLsol) se obtendrán de plantas de tomate sembradas en campo con síntomas del permanente del tomate. Estas plantas se trasladarán a invernadero y se verificará la presencia de la bacteria mediante PCR en punto final usando los primers OA2/Oi2c (5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3'/5'-GCCT CGCGACTTCGCAACCCAT-3') que amplifican un fragmento de 1160 pb del gen 16S rRNA de *C. Liberibacter solanacearum*, siguiendo el protocolo descrito por Liefting *et al.*, (2009). El producto de PCR se mandará a secuenciar y se comparará en el GenBank para asegurar que la secuencia pertenece a CLsol.

Colonia de insectos

Se establecerá una colonia de *B. cockerelli* en camas de siembra cubiertas con tela de organza y manteniéndose de plantas de tomate sano. Antes de iniciar los bioensayos de transmisión, se analizará por PCR una muestra de 10 insectos de cada una de las plantas colonizadas para verificar que CLsol no se encuentre presente.

Ensayo de transmisión

Se expondrán adultos de *B. cockerelli* a las plantas de tomate enfermas por un periodo de 24 h en camas de siembra. Pasado este tiempo, se colectarán y se pondrán en ayuno por 1 h dentro de cajas Petri. Posteriormente, se seleccionarán 30 adultos y se expondrán a plantas de tomate sanas por 7 periodos de tiempo diferentes (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4h, 8h y 24h) de acuerdo a lo reportado por Garzón-Tiznado *et al.* (2009). Se usará una cama de siembra con 5 plantas para cada periodo de tiempo. Pasado este tiempo, las plantas se retirarán de la cama de siembra y se conservarán en invernadero durante 30 días verificando si fueron infectadas con CLsol mediante PCR en punto final, qPCR y observando la aparición de síntomas de la enfermedad. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionará el tiempo de transmisión mínimo a usar para la determinación de los genes involucrados en la interacción *Bactericera cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum*-tomate

Determinación de genes involucrados en la interacción *Bactericera cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum*-*Solanum lycopersicum*

Fuente de inóculo y colonia de insectos

La fuente de inóculo serán plantas de tomate enfermas obtenidas mediante injerto de las plantas de tomate seleccionadas de campo del bioensayo previo. Se mantendrá la colonia de *B. cockerelli* usadas en el bioensayo previo en plantas de tomate sano. Antes de iniciar el bioensayo de transmisión, se analizará por PCR una muestra de 10 insectos de cada una de las plantas colonizadas para verificar que CLsol no se encuentre presente

Montaje del experimento y obtención de muestras vegetales

Se expondrán adultos de *B. cockerelli* a plantas de tomate enfermas por un periodo de 24 h en camas de siembra. Pasado este tiempo, se colectarán y se pondrán en ayuno por 1 h dentro de cajas Petri. Posteriormente, 30 adultos se expondrán a 5 plantas de tomate sanas por el tiempo de transmisión mínimo seleccionado en el bioensayo previo, dentro de una cama de siembra. Pasado este tiempo, se tomarán muestras de tallo y hoja de cada planta, se etiquetarán adecuadamente y se meterán en nitrógeno líquido, para su posterior almacenamiento a -20°C. Las plantas muestreadas se retirarán y se conservarán en invernadero durante 30 días verificando si fueron infectadas con CLsol mediante PCR en punto final, qPCR y observando la aparición de síntomas de la enfermedad.

De forma paralela, se tomarán al mismo tiempo muestras de tallo y hoja de plantas de tomate sanas que no hayan sido expuestas al insecto. Estas muestras se etiquetarán adecuadamente y se meterán en nitrógeno líquido, para su posterior almacenamiento a -20°C. Las plantas sanas también se conservarán en invernadero durante 30 días verificando que no exista presencia de CLsol mediante PCR en punto final, qPCR y observando la aparición de síntomas de la enfermedad.

Obtención de las bibliotecas sustractivas y secuenciación

La extracción de ARN total de las plantas sanas y de las enfermas se realizará por la técnica de Trizol (Invitrogen). A partir del ARN obtenido, se seguirán las instrucciones del fabricante del kit comercial PCR-Select cDNA Substraction (Clontech), para obtener dos bibliotecas sustractivas. En la primera se usará como muestra problema el ARN de las plantas de tomate infectadas con CLsol y *B. cockerelli*, y como muestra control el ARN de las plantas de jitomate no infectadas. De esta manera se obtendrán los genes que se expresan o sobreexpresan en la interacción del sistema en cuestión. Para la segunda biblioteca sustractiva, se usará como muestra problema el ARN de las plantas de jitomate no infectadas, y como muestra control el ARN de las plantas de tomate infectadas con CLsol y *B. cockerelli*. De esta manera se obtendrán los genes que se reprimen o subexpresan en la interacción.

El producto de cada una de las dos hibridaciones sustractivas se correrán en un gel de agarosa al 1.5% y de éste se cortarán las bandas iguales o mayores a 250 pb, las cuales se purificarán usando el kit QUIAEX II (QIAGEN). El producto purificado se usará para transformar células de *Escherichia coli* quimiocompetentes usando el kit comercial TOPO TA cloning for sequencing, with One Shot TOP10 Chemically competent *Escherichia coli* (ThermoFisher Scientific). Las clonas obtenidas se multiplicarán por separado en tubos Falcon de 15 ml con medio LB y los antibióticos ampicilina y kanamicina, y se seleccionarán algunas para mandar a secuenciar. Se generarán dos genotecas sustractivas preservando las clonas mandadas a secuenciar en tubos Eppendorf de 2 ml con glicerol y a -80°C para referencia posterior. Las secuencias obtenidas se compararán en el GenBank para determinar su posible

papel en el establecimiento de la interacción del sistema *Bactericera cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum*-*Solanum lycopersicum*, y se registrarán en el GenBank.

Verificación de la expresión diferencial de los genes obtenidos

Se realizará una cuantificación relativa mediante qPCR de algunas de las secuencias obtenidas y comparadas en el GenBank para verificar la expresión diferencial de éstas en el ADNc de las plantas sanas y enfermas usadas en el experimento.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Bioensayo 1	X	X	X	X								
Bioensayo 2					X	X	X	X				
Bioensayo 3									X	X	X	X
Publicación de un artículo								X				
Congreso								X				

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Bioensayo 1	5750	5750	5750	5750								
Bioensayo 2					5750	5750	5750	5750				
Bioensayo 3									5750	5750	5750	5750
Publicación de un artículo								3000				
Congreso								3000				

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2016	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5 -Productos Esperados

- Se obtendrá una estrategia para obtener colonias de *Bactericera cockerelli* libres de *Candidatus Liberibacter solanacearum*
- Se obtendrán dos genotecas sustractivas de los genes de tomate expresados diferencialmente en el establecimiento de la interacción del sistema *Bactericera cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum*-*Solanum lycopersicum*.
- Se publicarán dos artículos en revistas indexadas nacionales o internacionales de acuerdo a los resultados obtenidos
- Se graduará al menos a un estudiante de Maestría con una tesis derivada de este proyecto de investigación y a un estudiante de licenciatura

6 -Literatura Citada

Diatchenko, L, Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 6025-6030.

EPPO, 2013. EPPO Data Sheets on pests recommended for regulation. Bulletin EPPO Bulletin (2013) 43:197-201

Garzón-Tiznado, J. A.; Cárdenas-Valenzuela, O. G.; Bujanos-Muñoz, R.; Marín-Jarillo, A.; Becerra-Flora, A.; Velarde-Felix, S.; Reyes-Moreno, C.; González-Chavira, M. y Martínez-Carrillo, J. L. 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad 'permanente del tomate' en México. Agricultura técnica en México, 35(1), 61-72.

Guenther J., Goolsby J. y Greenway G. 2012. Use and cost of insecticides to control potato psyllids and zebra chip on potatoes. Southwestern Entomologist 37, 263-270

Gutierrez-Ibañez A. T.; Sanchez P., J. R.; Laguna C., A.; Ramirez D., J. F.; Balbuena M., A. y Alvarado G., O. G. 2013. Detection of *Ca Liberibacter solanacearum* and phytoplasma in potato crop (*Solanum tuberosum* L.) in Toluca Valley. Rev. Colomb. Biotechnol. 15:145-149.

Hirao, T.; Fukatsu, E. y Watanabe, A. 2012. Characterization of resistance to opine Wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. BMC Plant Biology 12:13

- INEGI, 2011. Volumen de la producción de tomate rojo (jitomate). México en cifras. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>
- Kushwaha, N., Sahu, P. P., Prasad, M., & Chakraborty, S. 2015. Chilli leaf curl virus infection highlights the differential expression of genes involved in protein homeostasis and defense in resistant chilli plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 99:4757-4770
- Legay, G., Marouf, E., Berger, D., Neuhaus, J. M., Mauch-Mani, B., y Slaughter, A. 2011. Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). *European journal of plant pathology*. 129:281-301.
- Liefting, L. W., Sutherland, P.W., Ward, L.I., Paice, K.L., Weir, B.S., Clover, G.R.G. 2009. A new 'Candidatus Liberibacter' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*. 93: 208-214.
- Munyanza J.E., Crosslin J.M. y Upton, J.E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip", a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100, 656–663.
- Munyanza J. E., Buchman J. L., Sengoda V.G., Fisher T. W. y Pearson C. C. 2011 Susceptibility of selected potato varieties to zebra chip potato disease. *American Journal of Potato Research* 88, 435–440
- Ojito-Ramos, K., y Portal, O. 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología vegetal*, 10: 3-19.
- Ordeñana, K. M. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, 63:22-32.
- Rodríguez G., M. y Rodríguez L., W. 2006. PCR en tiempo real. Métodos fisicoquímicos en biotecnología. IBT-UNAM. 55 p.
- Sengoda, V. G., Buchman, J. L., Henne, D.C., Pappu, H. R. y Munyanza, J. E. 2013. *Candidatus Liberibacter solanacearum* Titer over time in *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Trioziidae) after acquisition from Infected Potato and Tomato Plants. *J. Economic Entomol.* 106:1964-1972.
- SIAP, 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>