

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Obtención de variedades de cítricos expresando la  $\beta$ -defensina humana,  
para controlar la enfermedad Huanglongbing (HLB)”**

**TESIS**

Que presenta

**MIGUEL ANGEL GUERRA LUPIÁN**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de la Tesis: **DRA. GUADALUPE BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES**

**Ciudad de México**

**Octubre, 2018**

El presente trabajo de investigación para la obtención de grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología, se desarrolló en el Laboratorio 24 de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Bajo la Dirección de la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y con asesoría del Dr. Roberto Ruíz Medrano.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, gracias por el apoyo económico brindado para solventar mi manutención durante el periodo que realicé el Doctorado (Número de beca: 270975).

A mi Directora de Tesis, la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia, deseo reconocer su trabajo y dedicación permanente al presente proyecto de investigación, fundamentales para la concreción de este trabajo. Gracias también por su estimable paciencia y orientación.

Al Dr. Roberto Ruiz Medrano por la orientación, el soporte y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado.

A mi comité tutorial, especialmente al Dr. Jesús Hinojosa Moya por el apoyo, disposición y observaciones brindadas a lo largo de mi estancia en el programa de Doctorado, así como a los Doctores: María Eugenia Hidalgo Lara, Jaime Ortega López, Berenice Calderón Pérez, por su disposición, observaciones y consejos para la conclusión de éste proyecto.

Al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por el financiamiento otorgado para la realización del presente proyecto, por las facilidades otorgadas para el uso de algunas de sus instalaciones y el apoyo de su personal. Gracias también por la beca otorgada.

A la Auxiliar de investigación IQB. Silvia Beatriz Altamirano Morales gracias por la ayuda brindada en el laboratorio.

Al Dr. José Abel López Buenfil, Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, por la coordinación de su equipo de trabajo para el apoyo del presente proyecto.

A la Dra. Ruth Sandoval Luna<sup>†</sup>, y su equipo de trabajo del CESVY- Mérida, Yucatán, por su apoyo al presente proyecto.

Al Dr. Emiliano Loeza Kuk del INIFAP-Mocochá, Mérida Yucatán, por la donación de material vegetal utilizado en el presente trabajo, así como su apoyo en los trabajos de invernadero.

Al Ing. Domingo Colmenares Aragón y su equipo de trabajo de la Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal (ENECUSAV) ubicada en Querétaro, por su apoyo en la propagación de injertos y el mantenimiento en invernadero.

Al ingeniero Oscar M. Soto Ramos, por las facilidades otorgadas en su parcela, ubicada en Tecomán, Colima, para llevar a cabo experimentos en campo, así como por su apoyo durante las estancias realizadas.

A mis compañeros y amigos: Roberto, Josué, Eric, Humberto, Diego, Apolo, Jorge, Abraham, Alejandro, Alejandra, Berenice, Valentín, Angélica, Laura, Abel, Ariane, Lidia, Rebeca, Andrea, Liliana, Andrés, Francisco, Luis, Paul, Leandro, Brenda, José Luis, Estela y Lourdes, por su tiempo y apoyo en el laboratorio para la elaboración del proyecto, gracias por su amistad y por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Biotecnología: Gerardo, Juan, Johan, Ileana, Tere, Laura, gracias por su apoyo y amistad.

A mi familia por su apoyo incondicional.

## **DEDICATORIA**

A mis hijos Miguel, Rodrigo y Oscar, que me han dado la fortaleza para seguir adelante, buscando cumplir mis objetivos, por su cariño y comprensión.

A mis padres por ser un ejemplo en mi vida, por su apoyo incondicional.

## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Los cítricos .....	3
Huanglongbing .....	5
<i>Candidatus Liberibacter spp.</i> y su asociación con la enfermedad.....	9
Biología del insecto vector <i>Diaphorina citri</i> .....	18
Función del floema en plantas vasculares.....	22
Principales estrategias utilizadas para el control del HLB .....	33
$\beta$ - defensina humana.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS .....	45
Obtención de construcciones para transformación de cítricos e introducción en <i>A. Tumefaciens</i> y <i>A. Rhizogenes</i> .....	45
Transformación por medio de <i>A. tumefaciens</i> y <i>A. Rhizogenes</i> de explantes de limón mexicano.....	51
Germinación <i>in vitro</i> de semillas obtenidas a partir de limón mexicano .....	51
Preparación de <i>A. tumefaciens</i> y <i>A. Rhizogenes</i> para transformación.....	52
Transformación de explantes .....	52
Propagación de explantes transformados .....	53
Detección inmunoquímica (Western-blot) .....	57
Inmunolocalización en tejido del péptido $\beta$ -defensina .....	58
Expresión transitoria en plantas de limón mexicano infectado con HLB. ....	60
Expresión transitoria utilizando la fusión Csp16-DEF-GFP .....	65
RESULTADOS.....	66

Clonación del plásmido en <i>E. coli</i> y subclonación en <i>Agrobacterium</i> .....	66
Germinación <i>in vitro</i> de semillas de limón mexicano .....	66
Transformación genética .....	66
Análisis por PCR para identificar plantas de limón transgénicas .....	67
Estimación del contenido de <i>Candidatus Liberibacter</i> en las plantas .....	77
Medición de fotosíntesis de las plantas tratadas .....	79
Expresión transitoria utilizando la fusión Csp16-DEF-GFP .....	84
DISCUSION .....	87
CONCLUSIONES .....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Principales síntomas de HLB.....	6
Figura 2. Síntomas de HLB en campo.....	7
Figura 3. Micrografía electrónica de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. en floema de árboles infectados.....	12
Figura 5. Distribución mundial de <i>Candidatus Liberibacters</i> asociados a HLB e insectos vectores.....	21
Figura 6. Sistema vascular en plantas.....	23
Figura 7 Tejido vascular de plantas superiores.....	24
Figura 8 Localización y estructura de un plasmodesmo.....	26
Figura 9 Transporte de macromoléculas, a través de plasmodesmos.....	28
Figura 10 Los mecanismos de transporte de macromoléculas a través del plasmodesmo son complejos.....	29
Figura 11 Evidencia de la capacidad de movimiento de la proteína CmPP16.....	31
Figura 12 CmPP16 se sintetiza en célula acompañante y viaja a tubo criboso, coincidiendo con el sitio en el cual se desarrolla <i>Candidatus Liberibacter</i> .....	32
Figura 13 Presencia de transcritos móviles en la savia del floema de calabaza.....	33
Figura 14 El modelo de alfombras-agujero de gusano de acción de defensinas.....	41
Fig. 15 Frecuencia de codones en cítricos.....	47
Figura 16. Representación esquemática de la construcción genética utilizada.....	48
Fig. 17. Transformación de explantes.....	53
Figura 18. Propagación de explantes mediante injerto.....	55
Figura 19. Expresión transitoria.....	61
Figura 20. Aspecto de los síntomas presentes en las plantas empleadas en el ensayo en invernadero.....	62
Figura 21. Macrotúneles para ensayo de expresión transitoria.....	64
Figura 22. Inoculación de <i>Agrobacterium</i> con la construcción CsPP16-DEF-GFP.....	65
Figura. 23. Plantas regeneradas en invernaderos de bioseguridad.....	67



Figura 24. Resultado de la amplificación por PCR al ser visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa .....	68
Figura 25. Análisis de expresión de mRNA en plantas GM mediante rt-PCR.....	69
Fig.26 Cuantificación de la expresión mediante rt qPCR analizando por comparación de Ct.....	70
Figura 27. Western blot.....	72
Figura 28. Inmunolocalización en tejido del péptido $\beta$ -defensina.....	73
Figura 29. Las plantas inoculadas desarrollan pequeñas áreas fotosintéticas protuberantes a manera de callos.....	74
Figura 30. Desarrollo de pequeños tumores hiperproductores de antimicrobianos en los tallos de las plantas.....	75
Figura 31. Ejemplo del aspecto de las plantas expresando las proteínas antibacterianas.....	76
Figura 32. Cuantificación por PCR en tiempo real de la bacteria CLa en plantas tratadas con antimicrobianos a los 120 días de tratamiento. ....	78
Figura 33. Comparación de la carga bacteriana entre plantas inoculadas con la construcción $\beta$ -defensina, plantas sin tratamiento y plantas sanas. ....	79
Figura 34. Promedio de fotosíntesis registrado en hojas a los 90 días del experimento de expresión transitoria.....	80
Figura 35. Promedio de número de brotes nuevos presentes en los diferentes tratamientos. ....	81
Figura 36. Promedio de la longitud de los brotes nuevos en los distintos tratamientos. ....	82
Figura 37. Promedio de área foliar en brotes nuevos y preexistentes de los distintos tratamientos.....	83
Figura 38. El patrón de localización confocal antimicrobiano-GFP indica la acumulación específica en floema de la fusión proteica.....	85
Figura 39. Detección por PCR para GFP.....	86

## RESUMEN

Actualmente, Huanglongbing es considerada la enfermedad más devastadora de los cítricos en el mundo, causando pérdidas económicas importantes. La enfermedad es transmitida principalmente por el insecto vector *Diaphorina citri*, el cual, al alimentarse tanto de plantas sanas como enfermas inocula al agente causal *Candidatus Liberibacter*, una bacteria gram negativa limitada específicamente a los elementos cribosos del tejido vascular. Los cítricos afectados presentan síntomas como: moteado difuso en las hojas, frutos pequeños y deformes con inversión de colores, sabor amargo, con el tiempo el árbol muere de manera inevitable. Lo anterior, aunado a un periodo de latencia prolongado y a una velocidad alta de propagación. Entre las estrategias de control más promisorias se encuentra el mejoramiento genético utilizando péptidos antimicrobianos que contribuyan a la resistencia a la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue expresar el péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina Humana, fusionado a CsPP16 (proteína móvil) en cítricos y evaluar la resistencia a la infección de *Candidatus Liberibacter*. Para verificar lo anterior, se realizaron pruebas de expresión transitoria de la construcción proteica en plantas de limón mexicano en contacto con la enfermedad, así como transformación genética en plantas de limón mexicano, para verificar la presencia de dicha construcción y la expresión en los sitios que se requeridos. Como resultado se confirmó la presencia de la construcción genética por PCR, se detectó la presencia del transcrito mediante qRT-PCR, así como la fusión proteica mediante Western blot e Hibridación *in situ*. Confirmando que mediante éste método es posible expresar péptidos antimicrobianos en elementos cribosos del tejido vascular. Los resultados de los experimentos de expresión en mosaico en plantas enfermas, así como en plantas sanas en contacto con el vector de infección, indican que la expresión de la construcción  $\beta$ -defensina-CsPP16, disminuye la presencia de la bacteria causante de HLB, así como los síntomas de la enfermedad en plantas de limón mexicano.

## **ABSTRACT**

Currently, Huanglongbing is considered the most devastating citrus disease in the world, causing significant economic losses. The disease is transmitted mainly by the insect vector *Diaphorina citri*, which, feeding on both healthy and diseased plants, inoculates the causative agent *Candidatus Liberibacter*, a gram-negative bacterium limited specifically to the sieve elements of vascular tissue. Affected citrus fruits have symptoms such as: diffuse mottle on the leaves, small and deformed fruits with inverted colors, bitter taste, with time the tree inevitably dies. The above, coupled with a period of prolonged latency and a high speed of propagation. Among the most promising control strategies is genetic improvement using antimicrobial peptides that contribute to resistance to the disease. The aim of the present work was to express the human antimicrobial peptide  $\beta$ -defensin, fused to CsPP16 (mobile protein) in citrus fruits and to evaluate the infection resistance of *Candidatus Liberibacter*. To verify the above, transient expression tests of the protein construction in mexican lemon plants in contact with the disease were carried out, as well as genetic transformation in Mexican lemon plants, to verify the presence of said construction and the expression in the required sites. The presence of the genetic construct was confirmed by PCR, the presence of the transcript was detected by qRT-PCR, as well as protein fusion by Western blot and *in situ* hybridization. Confirming that by means of this method it is possible to express antimicrobial peptides in sieve elements of vascular tissue. The results of the mosaic expression experiments in diseased plants, as well as in healthy plants in contact with the vector of infection, indicate that the expression of the  $\beta$ -defensin-CsPP16 construction decreases the presence of the bacterium causing HLB, as well as the symptoms of the disease in mexican lemon plants.

## INTRODUCCIÓN

### Los cítricos

A nivel mundial, los cítricos representan uno de los productos más importantes con respecto a la producción y el comercio. En volumen de producción, ocupa el segundo lugar después del plátano (Statista, 2012), en términos de valor ocupa el primer puesto en el comercio internacional (UNCTAD, 2011). Los productos cítricos son generalmente apreciados por sus agradables sabores, fragancias, y colores, junto con sus atributos saludables, constituyendo una parte importante de la dieta humana (McCollum y Baldwin, 2016).

El género *Citrus* y géneros relacionados (*Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* y *Microcitrus*) pertenecen a la subfamilia de angiospermas *Aurantioideae* de la familia *Rutaceae*. Se cree que el centro de origen de los cítricos es el sudeste de Asia (Liu *et al.*, 2012). Investigaciones más recientes sugieren que el centro de origen de las especies de cítricos fue las estribaciones al sureste del Himalaya, en una región que incluye la zona oriental de Assam, al norte de Myanmar y el oeste de Yunnan (Wu *et al.*, 2018). Los registros históricos y los análisis genéticos sugieren que hay tres verdaderas especies del género *Citrus*: cidra (*C. medica*), mandarina (*C. reticulata*) y pummelo (*C. grandis*) (Moore, 2001). Todos los tipos cítricos comerciales, por ejemplo, naranja dulce (*C. sinensis*), pomelo (*C. paradisi*), mandarina, limón (*C. limon*), lima (*C. aurantifolia*), y sus cultivares, por ejemplo, naranja "Valencia", pomelo "Star Ruby", mandarina "Clementina", limón "Lisboa", lima "persa" y tangelo "Minneola" son híbridos interespecíficos o mutaciones de tipos de cítricos y pertenecen al género *Citrus* (McCollum y Baldwin, 2017). Aunque el origen geográfico, el tiempo y la dispersión de las especies de cítricos en el sudeste asiático siguen sin estar claros. Un obstáculo importante para resolver estas incertidumbres es nuestra poca comprensión de la genealogía de la mezcla compleja en los cítricos cultivados, como se ha demostrado recientemente (Wu *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018).

El nombre genérico se originó del latín, donde se refería a la planta ahora conocida como Citron (*C. medica*), o un árbol de coníferas (*Thuja*). De alguna manera está relacionado con la palabra griega antigua para cedro, κέδρος (kédros). Esto puede deberse a similitudes percibidas en el olor de las hojas y frutas cítricas con las del cedro (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Las plantas cítricas son árboles pequeños o grandes arbustos, que alcanzan de 5 a 15 metros de altura, con brotes espinosos y hojas dispuestas alternativamente, de hoja perenne con un margen entero. Las flores son solitarias o en corimbos pequeños (un racimo ramificado de flores con flores más bajas que tienen tallos más largos). Cada flor tiene de dos a cuatro centímetros de diámetro, con cinco (raramente cuatro) pétalos blancos y numerosos estambres; a menudo son muy fuertemente perfumados. La fruta distintiva es un hesperidium, una baya especializada con las partes carnosas internas divididas en segmentos (típicamente de 10 a 16) y rodeada por una corteza separable. El hesperidium es globoso a alargado, de 4 a 30 centímetros de largo y de 4 a 20 centímetros de diámetro. La corteza es correosa y los segmentos, están llenos de vesículas de pulpa (Katz y Weaver 2003).

La cidra llegó al oeste en la antigüedad, así como otros cítricos, particularmente el limón y la naranja agria (*Citrus aurantium*), trasladándose de Asia al Mediterráneo a lo largo de las rutas comerciales, llegando finalmente a América a través de exploradores españoles. La naranja dulce fue la última fruta cítrica importante introducida en Europa, traída por los portugueses del sudeste asiático y, durante muchos años, conocida como “Portugal”. El pomelo surgió en Barbados a partir de híbridos interespecíficos naturales entre naranja y pomelo (shaddock) en el siglo XVIII (Gmitter, 1995).

Según datos de la FAO (2017), México es el quinto país productor de cítricos a nivel mundial con aproximadamente 7% (7, 291t en 2015) del total que se produce, con una superficie plantada de 553 mil hectáreas. Por producto es el segundo productor de limón (12.29% de las exportaciones), el tercero en toronja y el cuarto en naranja (SAGARPA, 2017). La producción, procesamiento e

industrialización de cítricos generan 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos, dependiendo de esta actividad cerca de 67 mil familias (SAGARPA, 2009). El cultivo de naranja cuenta con cerca de 335 mil hectáreas, siendo el cítrico con mayor superficie sembrada con un total del 62% del área; seguido del cultivo del limón con 153 mil hectáreas que representan el 28% de la superficie sembrada de cítricos a nivel nacional (SIAP, 2008).

## **Huanglongbing**

La producción de cítricos, tanto en México como en el extranjero, está siendo amenazada por una enfermedad de origen asiático que ha cobrado gran importancia y que ha sido denominada Huanglongbing (HLB), conocida también como Citrus Greening y en China como enfermedad de los brotes amarillos. Es considerada una de las enfermedades más graves de los cítricos y se ha convertido en una importante amenaza para la producción mundial.

Es una de las enfermedades más complejas de los cítricos, con una red de interacciones entre patógenos, huéspedes, vectores, y el medio ambiente (incluyendo: clima, suelos, nutrición de las plantas, presencia de otros patógenos y plagas, etc.). Lo anterior, aunado a un prolongado periodo de latencia que dificulta su detección en campo, además de que el agente causal no ha podido ser cultivado *in vitro*, lo que lo convierte en un gran desafío para los investigadores, los organismos reguladores y la industria de los cítricos (da Graca *et al.*, 2016).

Hasta la fecha, no hay cura conocida, tratamientos o variedades resistentes a esta enfermedad. Los árboles infectados no sólo mueren después de unos pocos años de la infección, sino también producen frutos que no son adecuados para el consumo en fresco o producción de zumo debido a un aumento significativo en el sabor amargo y ácido en éstos (Bové *et al.*, 2006; Polek *et al.*, 2007; da Graca *et al.*, 2016). HLB es probablemente el problema más significativo frente a cualquier otro cultivo alimentario importante.

Los síntomas que presentan las plantas con enfermedad son un moteado difuso de las hojas, brotes y ramas que se vuelven amarillentos conforme avanza la enfermedad. Posteriormente las ramas y brotes se secan; el árbol pierde follaje y después de un tiempo, el árbol muere inevitablemente (Polek *et al.*, 2007) (Fig. 1).

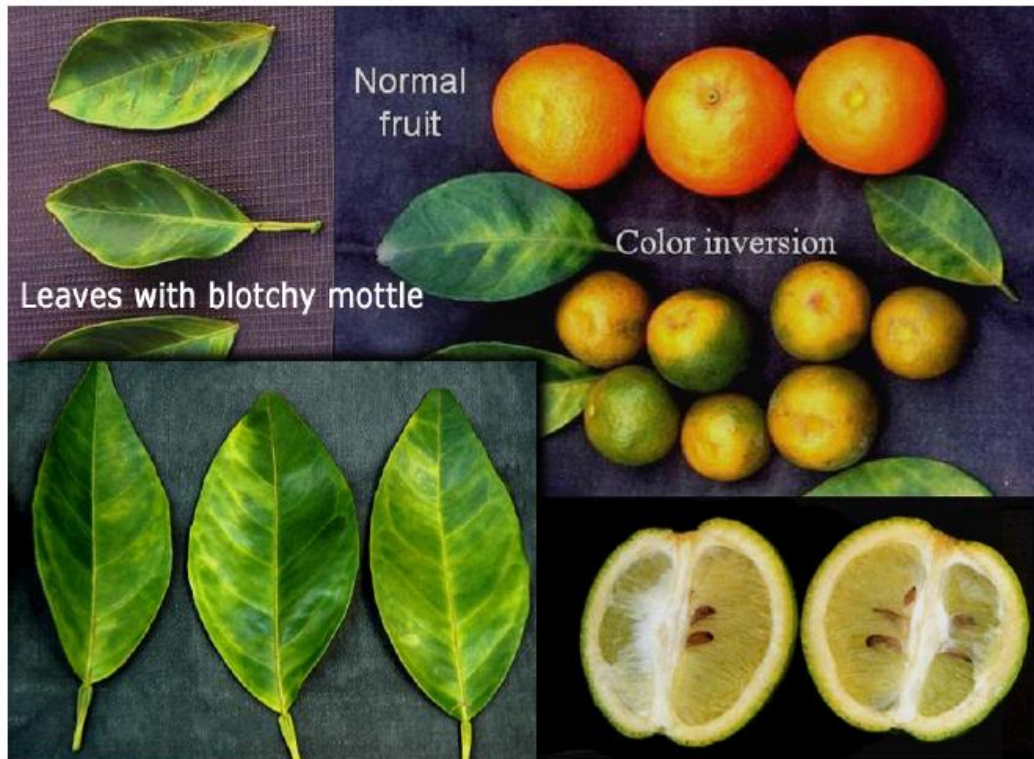


Figura 1. Principales síntomas de HLB. Imágenes superior e inferior izquierda, moteado difuso en hojas. Superior derecha comparación de frutos normales y frutos con síntomas de HLB. Inferior derecha semillas que no se desarrollan. Tomado de: National Research Council. 2010.

HLB es difícil de diagnosticar en base a los síntomas, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad. Existen numerosos síntomas asociados a HLB, sin embargo, los árboles de cítricos a menudo se ven afectados por otros problemas que pueden provocar síntomas similares (Bové 2006; Gottwald 2010; McCollum y Baldwin, 2017). El problema es que el HLB también es una enfermedad muy poco uniforme, especialmente al inicio del desarrollo, dentro de

árboles individuales, dentro de huertos y dentro de áreas de producción (Gottwald, 2010; McCollum y Baldwin, 2017).

Los síntomas de moteado solamente sirven como un indicador de la posible infección por la bacteria, ya que no son exclusivos de la enfermedad. En el caso de los frutos, su desarrollo se detiene, no se forman por completo, tienden a caerse, en algunos casos los frutos se deforman, tienen una coloración atípica (maduración inversa) y las semillas son abortivas. En campo puede utilizarse una técnica basada en la reacción yodo-almidón que sirve para hacer un diagnóstico tentativo; mediante el uso de una solución de yodo para teñir cortes foliares de plantas sospechosas, la reacción positiva al yodo se manifiesta por un cambio en la coloración del tejido (Etxeberria *et al.*, 2011). El diagnóstico requiere de técnicas moleculares, como la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Su, 2011).

Los síntomas en ocasiones son confundidos por deficiencias nutricionales, conforme avanza la infección la asimetría de las manchas cloróticas presentes en esta enfermedad se distingue de las manchas simétricas a ambos lados de las nervaduras centrales de las hojas, precisamente productos de una deficiencia nutricional (Fig. 2).



Figura 2. Síntomas de HLB en campo. Aspecto de árboles (izquierda) y hojas (derecha). Tomado de: National Research Council. 2010.

La enfermedad se ha expandido rápidamente a diferentes partes del mundo desde su detección en Asia oriental, y actualmente se ha detectado en los principales países productores, incluyendo México. Es bastante destructivo, llegando a causar



pérdidas totales en la producción. Se considera como la principal amenaza a la producción de cítricos a nivel mundial, siendo ya causa de graves pérdidas para la industria en América, África y Asia. (Bové 2006; Gottwald 2010; SENASICA, 2011; Shahzad *et al.*, 2017). En México representa una seria amenaza para 549 mil hectáreas de cítricos, que significan una producción de alrededor 7 millones de toneladas anuales con un valor aproximado de 10,206 millones de pesos (Salcedo *et al.*, 2012).

Durante décadas, el HLB ha causado devastación en las regiones productoras de cítricos en Asia y África, y en los últimos años se ha extendido a América (da Graca, 2008; Stokstad, 2012; Bové, 2014). La enfermedad fue reportada por primera vez en China en 1919, por Reinking, mientras evaluaba enfermedades de plantas de interés económico en el sur de China usando el término en inglés "yellow shoot" de cítricos en el informe, sin embargo, en ese momento no se le dio importancia (Bové, 2006). Se reportó en África en la década de 1920 en áreas donde la citricultura se estaba expandiendo (Van der Merwe y Andersen, 1937). Para 1936 ya se había convertido en un problema serio. Más recientemente, HLB se confirmó en América, originalmente en el estado de São Paulo, Brasil en 2004 (Teixeira *et al.*, 2005) y en el Estado de Florida, Estados Unidos en 2005 (Halbert, 2005). Propagándose rápidamente tanto en Sao Paulo como en Florida, causando pérdidas económicas significativas como lo ha hecho en Asia durante muchos años. HLB se trasladó a países vecinos de Brasil así como Argentina y Paraguay (Lopes *et al.*, 2013). En los Estados Unidos, el HLB se ha detectado en otros importantes estados productores de cítricos, Texas (Kunta *et al.*, 2012; da Graca *et al.*, 2015), California (Kumagai *et al.*, 2013), así como en Carolina del Sur y Luisiana (Halbert *et al.*, 2010). La enfermedad también está extendida en varios países del Caribe, como Cuba (Luis *et al.*, 2009), Jamaica (Oberheim *et al.*, 2011), Belice (Manjunath *et al.*, 2010) y México (Trujillo-Arriga *et al.*, 2010). Otras grandes zonas de cultivo de cítricos de la cuenca mediterránea y Australia están ahora bajo amenaza. HLB se ha trasladado al oeste de Pakistán, a Irán (Faghihi *et al.*, 2009), amenazando a Turquía. El psílido africano (insecto vector), recientemente se encontró en España (Perez-Otero *et al.*, 2015). La razón principal de devastación

es el largo período de latencia entre la infección y la manifestación de los síntomas, y el hecho de que los síntomas pueden parecerse a otros síntomas en cítricos. El estado de San Paulo Brasil, eliminó alrededor de 6 millones de árboles infectados para el año 2008 (Belasque *et al.*, 2010). En 10 años desde su introducción, la industria de cítricos de Florida perdió más del 50% de sus cítricos y la producción continúa disminuyendo a un ritmo alarmante (Gottwald, 2010; USDA National Agricultural Statistics Service, 2015). A nivel mundial el HLB ha ocasionado la eliminación de más de 100 millones de árboles. En Brasil, se han erradicado alrededor de 46,2 millones de árboles de cítricos (que representan el 26% de los árboles actualmente plantados) desde la detección en 2004 (USDA CITRUS, 2017). Está cambiando el manejo tradicional de la citricultura y, en algunas partes del mundo, está forzando a los pequeños productores a buscar otras opciones productivas, al no contar con los medios, sobre todo económicos, para enfrentarla (Santivañez, *et al.*, 2013).

### ***Candidatus Liberibacter spp.* y su asociación con la enfermedad**

HLB es el resultado de una infección por la bacteria *Candidatus Liberibacter*, una bacteria Gram negativa (Bové, 2006). A pesar de que los postulados de Koch no se han cumplido debido a la incapacidad de cultivar los patógenos putativos, una amplia evidencia ha establecido Liberibacters como los agentes causantes de HLB (Nian *et al.*, 2017). En Brasil y China se han descrito fitoplasmas asociados a HLB, también restringidos al sistema vascular de las plantas infectadas. El género *Candidatus* pertenece a la subdivisión  $\alpha$  de la clase Proteobacteria (Jagoueix *et al.*, 1994; Texeira *et al.*, 2005). El nombre de “*Candidatus Liberibacter*” se deriva del término “*Candidatus*” que se utiliza para asignar a los organismos que no pueden ser cultivados y por lo tanto no pueden ser clasificados y caracterizados con las técnicas tradicionales (Murray and Schleifer, 1994; Murray and Stackebrandt, 1995) y por el nombre trivial de “*Liberibacter*” del latín *Liber* (corteza) y *bacter* (bacteria), (Jagoueix *et al.*, 1994).

Las especies de *Candidatus Liberibacter* son parásitos obligados de las plantas y los psílidos, y solo pueden multiplicarse dentro de sus hospedadores eucariotas (Haapalainen, 2014). Los intentos de cultivar estas bacterias *in vitro* no han tenido éxito hasta el momento, lo que restringe el uso de la mayoría de los métodos microbiológicos desarrollados para la caracterización bacteriana (Haapalanien, 2014; Louzada *et al.*, 2016). Las secuencias de DNA indican que se trata de una alfa-proteobacteria (Jagoueix *et al.*, 1994). La relación taxonómica de *Candidatus Liberibacter spp.* con otros grupos no es completamente clara. De acuerdo con las comparaciones de secuencias génicas, las especies de *Candidatus Liberibacter* pertenecen al orden Rhizobiales de la subdivisión  $\alpha$ 2-Proteobacterias Gram negativas, y forman un grupo monofilético que divergió temprano de las otras  $\alpha$ -Proteobacterias (Jagoueix *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2009; Liefting *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Leonard *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2013; Fagen *et al.*, 2014). La información disponible (16S rDNA) permite suponer que se encuentra relacionada con rizobacterias, así como *Agrobacterium* (Wang *et al.*, 2017). Las bacterias de estos grupos, tienen una pared celular compuesta con peptidoglucano por lo tanto, podrían ser susceptibles a enzimas que la destruyen.

Existen tres variantes de esta bacteria, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas), *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus*. Adicionalmente cuatro subespecies de *Candidatus Liberibacter africanus* también han sido reconocidos: *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis* (LafC), *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *clausenae* (LafCl), *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *zanthoxyli* (LafZ) y *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *vepridis* (LafV) (Roberts *et al.*, 2015). En México se ha descrito que *Candidatus Liberibacter asiaticus* es la bacteria asociada a la enfermedad, la cual es transmitida por el psílido *Diaphorina citri* encontrándose presente en varias especies de la familia de las rutáceas incluyendo plantas ornamentales (Jagoueix *et al.*, 1994; Texeira *et al.*, 2005).

Varios experimentos han demostrado que la acumulación de callosa en hojas de plantas de cítricos infectadas con HLB ocurre específicamente en las nervaduras

centrales (Kim *et al.*, 2009; Folimonova y Achor 2010). Lo anterior acompañado con la deposición amorfa de callosa en los poros de los elementos cribosos, el tejido afectado también exhibe otras estructuras aberrantes, entre ellas, el tejido del cambium desordenado (Kim *et al.*, 2009; Aritua *et al.*, 2013), acumulación masiva de almidón (Kim *et al.*, 2009; Folimonova y Achor, 2010) y floema necrótico (Kim *et al.*, 2009). Ésta aberración es bastante similar a otra enfermedad de los cítricos restringida al floema causada por especies de *Ca* fitoplasmas, que inducen deposición de callosa en placas de los elementos cribosos y eventualmente destruyen la función del floema causando necrosis y colapso de los elementos cribosos (Lee *et al.*, 2000). La deposición de callosa observada consistentemente puede sugerir un papel importante que desempeña en la respuesta de defensa de los cítricos (da Graca *et al.*, 2016).

La acumulación en floema de estos patógenos parece causar la mayor parte de la sintomatología observada (Fig. 3). Análisis ultraestructural de tejido infectado ha demostrado que el libre flujo del floema es bloqueado por depósitos masivos de callosa (beta 1-3 glucanas) en las placas cribosas. Los órganos de la planta que están interconectados a través de los haces vasculares bloqueados desarrollan clorosis (Bové *et al.*, 2006; Koh *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2014); esto seguramente causa una menor tasa en el crecimiento de las plantas infectadas. La acumulación de callosa podría ser una respuesta descontrolada a la presencia de estas bacterias en el floema.

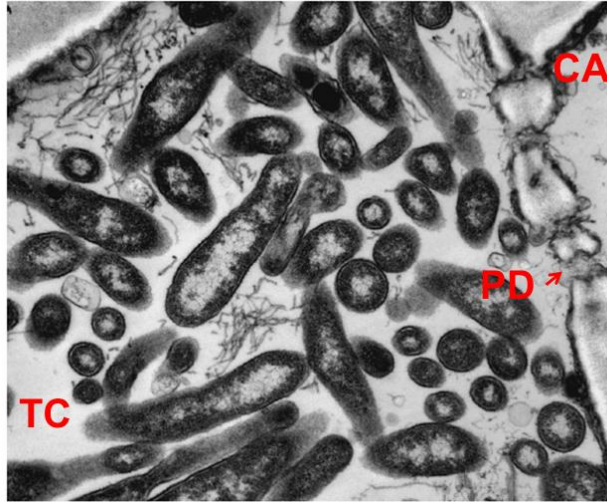


Figura 3. Micrografía electrónica de *Candidatus Liberibacter* sp. en floema de árboles infectados. TC: Tubo criboso, PD: plasmodesmo. Tomado de: National Research Council. 2010.

La acumulación de callosa causa acumulación de almidón en los elementos cribosos, y cambios ultraestructurales del tejido del floema, poros tapados del elemento criboso y, finalmente, el floema interrumpido. En las células cítricas, muchas actividades metabólicas pueden activar los síntomas del HLB. Por ejemplo, la acumulación de almidón está relacionada con procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración y la disponibilidad de energía (da Graca *et al.*, 2016).

Como puede observarse en la figura 3, la bacteria está restringida a tubos cribosos (TC), la conexión simplásmica del TC con la célula acompañante (CA) se conoce como plasmodesmo y está obstruido por material fibrilar y amorfo. La identificación bioquímica de estos depósitos sugiere que se trata de beta 1-3 glucana (callosa) y proteína "cicatrizante" denominada PP2. Ambas moléculas son sintetizadas y depositadas en los plasmodesmos y poros de los elementos cribosos como una reacción de hipersensibilidad.

Cuando los cítricos se infectan con *Candidatus Liberibacter*, la proteína 2 del floema (PP2) se induce específicamente (Albrecht y Bowman, 2008; Kim *et al.*, 2009; Mafra *et al.*, 2013). PP2 es una de las proteínas necesarias para conectar los poros de las placas cribosas, y se ha sugerido que funciona como una respuesta de defensa que puede restringir la propagación de *Candidatus Liberibacter* en los tubos de los elementos cribosos (Musetti *et al.*, 2010). Sin embargo, el papel que desempeña PP2 en la defensa de los cítricos no es concluyente, ya que PP2 no se induce en la etapa temprana de la infección por *Liberibacter*. En cambio, la inducción de PP2 en realidad podría contribuir a la obstrucción de los elementos cribosos, lo que agrava aún más los síntomas de HLB (Wang y Trivedi, 2013).

Posteriormente, esta acumulación bloquea el transporte de nutrientes y altera el metabolismo de los hidratos de carbono, lo que provoca cambios fenotípicos en el árbol de cítricos, como la reducción del crecimiento de la raíz, moteados amarillentos y manchas en las hojas y finalmente frutas con inversión de color (Fan *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2012; Aritua *et al.*, 2013).

Uno de los principales factores que contribuyen a la rápida propagación y devastación del HLB es la falta de resistencia natural de los huéspedes: no se han identificado aún árboles o plántulas o combinaciones de vástagos-portainjertos de cítricos resistentes. Sin embargo, el período largo y variable de incubación para el desarrollo de los síntomas de HLB (Manjunath *et al.* 2008; Shen *et al.*, 2013), sugiere claramente que las plantas luchan contra la enfermedad (da Graca, 2016).

Recientemente, el empleo de múltiples técnicas moleculares como, comparación de la transcripción, expresión de proteínas y perfiles de expresión de ARN han revelado que existen moléculas expresadas diferencialmente entre cítricos con presencia de *Candidatus Liberibacter* y plantas sanas (Albrecht y Bowman, 2008; Kim *et al.*, 2009; Aritua *et al.*, 2013; Nwugo *et al.*, 2013a, 2013b; Zhao *et al.*, 2013). Estas moléculas expresadas diferencialmente son diversas en origen y funciones, lo que hace que sea difícil para que apunte a una cascada de señalización específica o una ruta metabólica con un papel regulador predominante sobre la

inmunidad innata contra infección de *Candidatus Liberibacter*. Sin embargo, diversos componentes de la inmunidad innata se han identificado consistentemente en diferentes especies de cítricos desafiados con diversas especies de *Candidatus Liberibacter* (Kim *et al.*, 2009; Nwugo *et al.*, 2013b; Wang y Trivedi, 2013), lo que demostraría la innegable conservación de la inmunidad innata de las plantas de cítricos (da Graca, 2016).

Acelerada por la necesidad de más información sobre enfermedades asociadas a *Candidatus Liberibacter*, la investigación sobre la epidemiología, la biología molecular y la virulencia de estas bacterias están progresando a gran velocidad (Haapalanien, 2014). Se han obtenido recientemente las secuencias de los genomas de la mayoría de especies de *Candidatus Liberibacter* las cuales presentan una elevada semejanza entre sí (Hartung *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011). Las especies de *Candidatus Liberibacter* no están relacionadas con fitoplasmas, que descienden de bacterias Gram-positivas, a pesar del estilo de vida similar de ser bacterias que habitan en el floema transmitidas por insectos (Hogenhout *et al.*, 2008; Haapalanien, 2014).

Entre los parientes más cercanos conocidos de *Candidatus Liberibacter* son las especies de *Bartonella* patógenas para animales y humanos transmitidas por insectos y patógenos intracelulares pertenecientes a especies de *Brucella*, así como, especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium* asociadas a plantas. Común a todas estas bacterias es su estrecha relación con un organismo huésped eucariota. Las especies de *Candidatus Liberibacter*, son parásitos obligados que dependen de sus hospederos vivos, la evolución de estas bacterias tiene que seguir la evolución de los organismos hospederos eucariotas, que responden a los entornos cambiantes y a las plagas y patógenos en evolución (Haapalanien, 2014). La comparación de las secuencias disponibles de éstos patógenos indica rearrreglos divergentes en sus genomas, en los que la ganancia y pérdida de material genético ha contribuido a diferencias en sus genomas. *Candidatus Liberibacter* conforma un clado compacto con un “estilo de vida” adaptado al floema de plantas, que incluye por ejemplo una capacidad limitada de síntesis de

ciertos aminoácidos y ácidos nucleicos. Debido al estilo de vida en el floema y la evolución reductiva, los Liberibacters, contiene muy pocos rasgos de virulencia en comparación con otras bacterias de vida libre patógenas de plantas como *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 2017).

La comparación con el genoma de una rhizobacteria, *Sinorhizobium meliloti*, indica que, si bien ambas bacterias están claramente emparentadas, *Candidatus Liberibacter* presenta un genoma más pequeño, con un contenido de A/T mucho más elevado, y con una capacidad potencial de reparar DNA limitada deducida de la ausencia de dominios de exonucleasa en su DNA polimerasa y, la presencia de un solo gen para DNA ligasa, contra 10 de *S. meliloti* (Hartung *et al.*, 2011). Más importante para el desarrollo de este proyecto es el hecho que *Candidatus Liberibacter* es susceptible a antibióticos beta-lactámicos, lo que indica que su pared celular es semejante a la de otras bacterias que presentan peptidoglicano (Bové, 2006).

Actualmente, se ha logrado obtener algunos medios de cultivo que mantienen por poco tiempo a la bacteria aislada (Davis *et al.*, 2008 y Duan *et al.*, 2009). Sin embargo, como se menciona anteriormente los postulados de Koch no se han completado aún para ninguna de las tres especies asociadas con la enfermedad del HLB. La bacteria responsable del HLB se encuentra distribuida de manera irregular a lo largo del sistema vascular de árboles infectados (Brlansky y Rogers, 2007). Por lo que cuando se realiza la propagación de material vegetal infectado a través de injertos, es posible que no todos los árboles resulten infectados. La diseminación de la infección varía enormemente y depende, entre otras cosas, de la concentración de inóculo en el árbol madre (Pacheco *et al.*, 2012). Por tal motivo se pueden encontrar árboles con HLB que contengan secciones “libres” de la bacteria o bajas concentraciones de inóculo en esas secciones en árboles infectados que estén por debajo del umbral de detección por el método de PCR (Gottwald, 2010). Por otra parte, la baja concentración de bacterias que no logra ser detectada por PCR, puede ser transportada por el floema de la planta, succionada por el psílido al alimentarse y posteriormente ser transmitida a otros



árboles (Gottwald, 2010). Tal variabilidad dentro de los árboles sintomáticos requiere una inspección visual de los síntomas de la enfermedad para asegurar la detección bacteriana (Kunta *et al.* 2014).

En lugares en donde la enfermedad carece de un control efectivo y donde los árboles son jóvenes (hasta 3 años), el HLB puede alcanzar más del 50% de incidencia en un periodo de 3 a 5 años. Debido al rápido progreso de la enfermedad en las huertas, combinado con la baja producción de fruta, éstas se volverán económicamente inviables en 7 a 10 años (Roistacher, 1996). Por cada planta que presenta síntomas se estiman de dos a 56 plantas asintomáticas positivas a HLB, (Gottwald, 2010). Por lo tanto, es posible que existan más plantas y huertas con HLB sin detectar que las que son detectables a simple vista y mediante la técnica de PCR.

Halbert y Manjunath, 2004, reportan una compilación de plantas hospedantes de la bacteria causante del HLB.

Aeglopsis chevalieri Swingle  
Atalantia missionis Oliver  
Balsamocitrus dawei Stapf.  
Calodendrum capensis Thunb.  
Catharanthus roseus (L.) G. Don (Apocynaceae)  
X Citroncirus webberi J. Ingram & H.E. Moore  
Citrus amblycarpa Ochse  
Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle  
Citrus aurantium L.  
Citrus depressa Hayata  
Citrus grandis (L.) Osbeck  
Citrus hassaku Hort. ex Tanaka  
Citrus hystrix DC.  
Citrus ichangensis Swingle  
Citrus jambhiri Lushington

Citrus junos Sieb. ex Tanaka  
Citrus kabuchi Hort. ex Tanaka  
Citrus limon (L.) Burm. f.  
Citrus × limonia Osbeck  
Citrus × nobilis Lour. 'Ortanique'  
Citrus × nobilis Lour.  
Citrus oto Hort. ex Tanaka  
Citrus × paradisi Macfad.  
Citrus reticulata Blanco  
Citrus sinensis (L.) Osbeck  
Citrus sunki Hort. ex Tanaka  
Citrus unshiu (Mack.) Marc  
Citrus sp. (mandarins)  
Citrus sp. (pomelo/shaddock)  
Clausena indica Oliver  
Clausena lansium (Lour.) Skeels  
Cuscuta australis R. Br. (Convolvulaceae (Cuscutaceae))  
Fortunella spp.  
Limonia acidissima L.  
Microcitrus australasica (F. J. uell.) Swingle  
Murraya koenigii (L.) Sprengel  
Murraya paniculata (L.) Jack  
Nicotiana tabacum L. 'Xanthii' (Solanaceae)  
Poncirus trifoliata (L.) Raf  
Severinia buxifolia (Poiret) Ten.  
Swinglea glutinosa (Blanco) Merr.  
Toddalia lanceolata Lam  
Triphasia trifolia (Burm. f.) P. Wilson

## Biología del insecto vector *Diaphorina citri*

El HLB se transmite por medio de vectores, el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, es el vector responsable de la propagación de la bacteria en Asia y América, mientras que la bacteria en África es transmitida por otra especie de psílicos conocido como *Trioza erythrae* (da Graça, 2008). Psílicos portadores de cualquiera de estas bacterias pueden infectar árboles saludables al alimentarse de ellos. Como se alimenta en el árbol, el psílido inyecta la bacteria en el floema, lo que permite que se convierta en una parte del sistema vascular de la planta. Independientemente de la variedad, los síntomas de HLB son similares y los signos reveladores incluyen un moteado con manchas de las hojas, muerte regresiva de ramitas, y la caída de la fruta. La fruta producida por árboles severamente afectados puede ser asimétrica, permanecen verdes en el extremo estilar, la semilla no se desarrolla, presenta haces vasculares descoloridos, y tienen un sabor amargo (Gottwald *et al.* 2010).

La especie, *Diaphorina citri* (= *Euphalarus citri* (Kuwayama 1908)) fue descrita de colectas realizadas en árboles de cítricos en Schinchiku, Taiwan en 1907 (Halbert y Manjunath, 2004). El género *Diaphorina*, como miembro de la familia Liviidae (antes Psyllidae; Burckhardt y Ouvrard, 2012), pertenece al orden Hemiptera y al suborden Stenorrhynca junto con los áfidos o pulgones, los filoxeras, las escamas y las mosquitas blancas (Pacheco-Covarrubias *et al.*, 2012).

Los psílicos se caracterizan por ser insectos de tamaño pequeño parecidos a las “chicharras”. Poseen dos pares de alas membranosas. Las alas del metatórax (delanteras) son de consistencia más dura que las alas mesotorácicas (alas posteriores). La venación alar es simple sin especializaciones particulares. A diferencia de otras familias cercanas, presentan un rostrum dirigido hacia atrás, el cual, sobrepasa la base de las patas anteriores; éstas presentan tarsos de 2 segmentos con un par de uñas. Las patas posteriores son más gruesas y fuertes, ya que están adaptadas para saltar. Las antenas presentan 10 segmentos. Los adultos de esta familia son activos y pueden saltar o volar cuando son

perturbados. Tanto los adultos como las ninfas se alimentan al succionar la savia de una gran variedad de plantas hospedantes. Las ninfas de estos insectos son menos activas que los adultos y aunque algunos estados inmaduros pueden formar agallas la mayoría son de vida libre (Pacheco-Covarrubias *et al.*, 2012).

Con respecto a *Diaphorina citri*, los adultos presentan un patrón característico de coloración en las alas anteriores lo que les permite ser separados de las otras especies pertenecientes al género *Diaphorina* (*D. amonea*, *D. auberti*, *D. communis*, *D. murrayi*, *D. punctulata* y *D. zebrana*) reportadas en cítricos y especies cercanas. Las alas de *D. citri* tienen dibujos en forma de barras en la parte basal y distal que le confieren un patrón en forma de X al insecto cuando está en una vista lateral (Fig.4). El patrón de la venación es la típica de los psílidos; el segundo par es membranosa transparente (Halbert y Manjunath, 2004). Los adultos miden entre 3 y 4 mm de longitud, presentan las alas anteriores anchas hacia la mitad apical, con un moteado característico, con una banda longitudinal que no alcanza el ápice. Presentan un cuerpo de color marrón moteado recubierto de cera, la cabeza es de color marrón con los ojos rojos. Las antenas tienen dos manchas de color marrón claro en la parte media y las puntas negras. Los adultos presentan un parado característico que va de 30 a 45 grados, de tal suerte que la cabeza queda casi tocando el tejido vegetal y la parte final del abdomen queda elevada. Estos saltan cuando son molestados y pueden realizar ligeros desplazamientos a través de un vuelo propio, por lo que pueden trasladarse de árbol a árbol (Halbert y Manjunath, 2004; Pacheco-Covarrubias *et al.*, 2012; Mead y Fasulo, 2017). Un *Diaphorina citri* vivo está cubierto de secreción blanquecina y cerosa, lo que la hace parecer polvoriento (Mead y Fasulo, 2017).

La hembra ovíparosita en los brotes, hojas jóvenes, así como en las axilas de las mismas (Huang *et al.*, 1999; Mead y Fasulo, 2017). Los huevecillos son de aproximadamente 0.3 mm de longitud, elongados, más anchos en su base y se estrechan en su extremo distal. Inicialmente presentan un color pálido para posteriormente tornarse amarillos y finalmente, hacia el momento de la eclosión,

éstos cambian a un color naranja (Pacheco-Covarrubias *et al.*, 2012; Mead y Fasulo, 2017).

El insecto pasa por cinco instares ninfales. Las ninfas son de forma elíptica, planas en su parte dorsal y convexo por la ventral (Fig. 4), su coloración va desde el amarillo, en los primeros estadios ninfales, pasando por el verde, hasta el gris al final de su desarrollo ninfal. Las ninfas presentan característicos filamentos cerosos en sus bordes. Las ninfas de primer instar miden alrededor de 0.25 mm de longitud, mientras que las ninfas de quinto instar pueden alcanzar hasta 1.7 mm de longitud y presentan cojinetes alares abultados. Las ninfas a pesar de que presentan un comportamiento sedentario pueden llegar a desplazarse entre los brotes de sus hospedantes, sobre todo cuando son disturbadas (Fonseca *et al.*, 2007; Pacheco-Covarrubias *et al.*, 2012).



Fig. 4. Adulto y ninfas de *Diaphorina citri*. Tomado de: National Research Council. 2010.

Liu y Tsai (2000), indican que el crecimiento de la población de *Diaphorina citri* es entre los 10° y 32°C siendo el rango óptimo de temperaturas de 25° a 28 °C.

*Diaphorina citri* se extiende principalmente en Asia tropical y subtropical y se ha reportado en las siguientes áreas geográficas: Afganistán, Caribe (Bahamas, Islas Caimán, Jamaica, República Dominicana, Cuba y Puerto Rico, más las interceptaciones de Santo Tomás y Belice), América Central (Guadalupe), China, Hong Kong, India, Indonesia, Malasia, Mauricio, México, Myanmar, Nepal, Pakistán, Islas Filipinas, La Reunión, Islas Ryukyu, Arabia Saudita, Sri Lanka, América del Sur (Argentina, Brasil, Venezuela), Taiwán, Tailandia y los Estados Unidos (Halbert y Núñez 2004, Bové, 2006).

La presencia del psílido no implica que esté infectado con la bacteria, aunque en nuestro país, están ambos elementos, como se muestra en la siguiente figura.

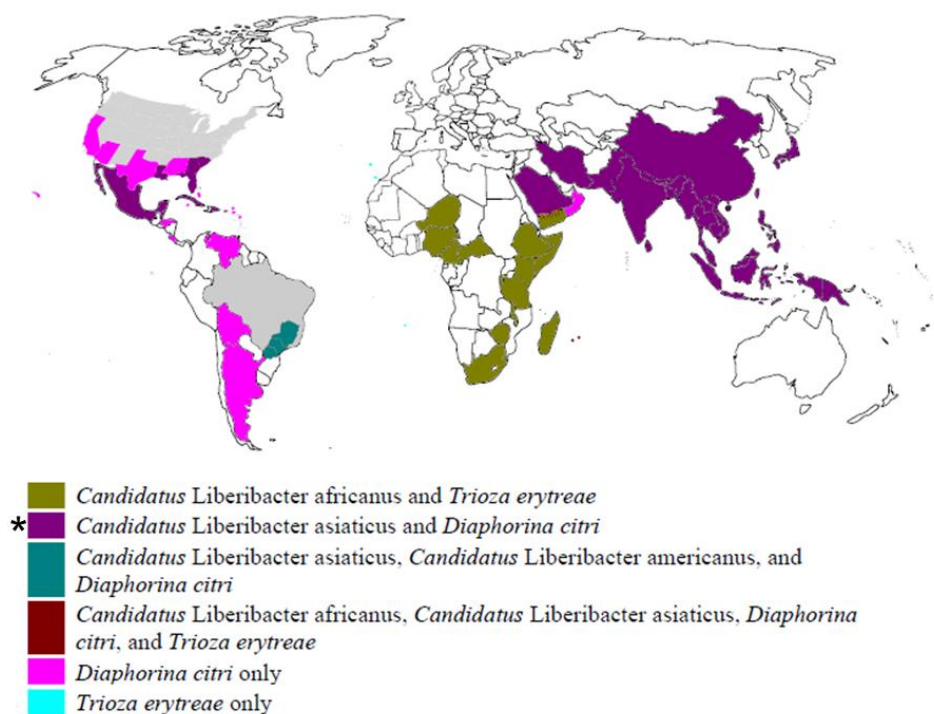


Figura 5. Distribución mundial de *Candidatus Liberibacter* asociados a HLB e insectos vectores. En color morado se muestra la presencia de la bacteria y su vector en México, el cual es común en Florida y Asia. National Research Council. 2010.

El proceso de transmisión de *Candidatus Liberibacter* a través de los psíldos ocurre de manera persistente. La bacteria se ha detectado en varios órganos del insecto vector, como las glándulas salivales, el intestino medio, la grasa, la cámara

de filtración, la hemolinfa, los tejidos musculares y los ovarios (Ammar *et al.*, 2011).

Por la naturaleza agresiva del patógeno, la mayoría de los árboles infectados mueren en un plazo de 3 a 10 años. Salcedo *et al.* (2010) hacen un trabajo exhaustivo sobre el efecto del HLB en la industria citrícola mexicana y recomiendan:

- Eliminación de plantas enfermas.
- Utilización de plántulas de viveros certificados.
- Control del vector. En este caso, por ser de rápido efecto se recomienda el uso de insecticidas químicos.

### **Función del floema en plantas vasculares**

Como ya se mencionó anteriormente, *Candidatus Liberibacter asiaticus* es una bacteria restringida al floema de su huésped. Existe una gran variedad de patógenos de plantas que afectan al floema, o bien están restringidos a este tejido, desde virus, protozoarios, hasta bacterias (micoplasmas principalmente) (Dollet, 1984; Bové y Garnier, 2002; Fletcher y Wayadanda, 2002; Vuorinen *et al.*, 2011; Hogenhout *et al.*, 2008 Porcel *et al.*, 2014; Bendix y Lewis 2016). El conocimiento de la función de este tejido es esencial para desarrollar estrategias para el control de estos patógenos.

A diferencia de los organismos unicelulares que pueden absorber nutrientes directamente a través de la membrana, los organismos multicelulares han desarrollado sistemas circulantes, denominados tejidos vasculares, para

suministrar recursos esenciales a cada célula (Cho *et al.*, 2017). El transporte de nutrientes en plantas ocurre a través del tejido vascular, extensa red de vasos que derivan de células altamente modificadas. Está constituido por el xilema, que transporta tanto agua como nutrientes minerales de la raíz al resto de la planta, y el floema, que distribuye azúcares, aminoácidos y otros nutrientes de los tejidos fotosintéticamente activos a los que no son capaces de fotosintetizar (Taiz y Zeiger, 2002).

El sistema vascular de la planta lleva a cabo dos funciones esenciales: la distribución de recursos a los diversos órganos de la planta y la provisión de soporte mecánico. Además, el sistema vascular sirve como un eficaz sistema de comunicación a larga distancia, el floema y el xilema sirven para ingresar información relacionada con las condiciones abióticas y bióticas por encima y debajo del suelo, respectivamente (Fig. 6.). Esta combinación de suministro de recursos y entrega de información, que incluye hormonas, hormonas peptídicas, proteínas y ARN, permite que el sistema vascular participe en la coordinación de los procesos de desarrollo y fisiológicos a nivel de toda la planta (Lucas *et al.*, 2013; Xoconostle-Cázares *et al.*, 2016).

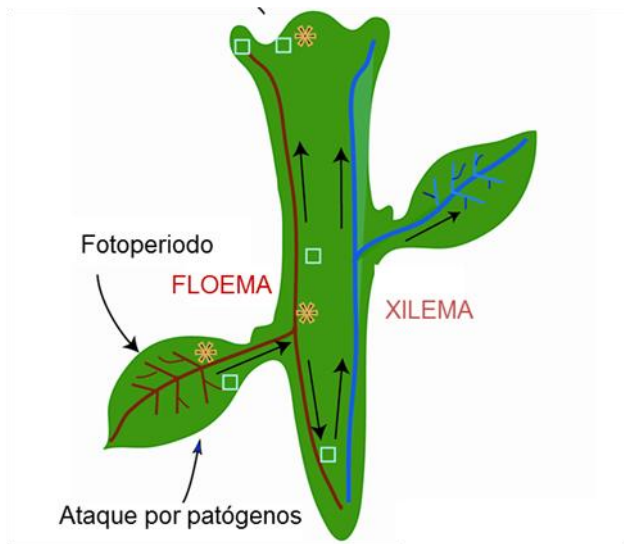
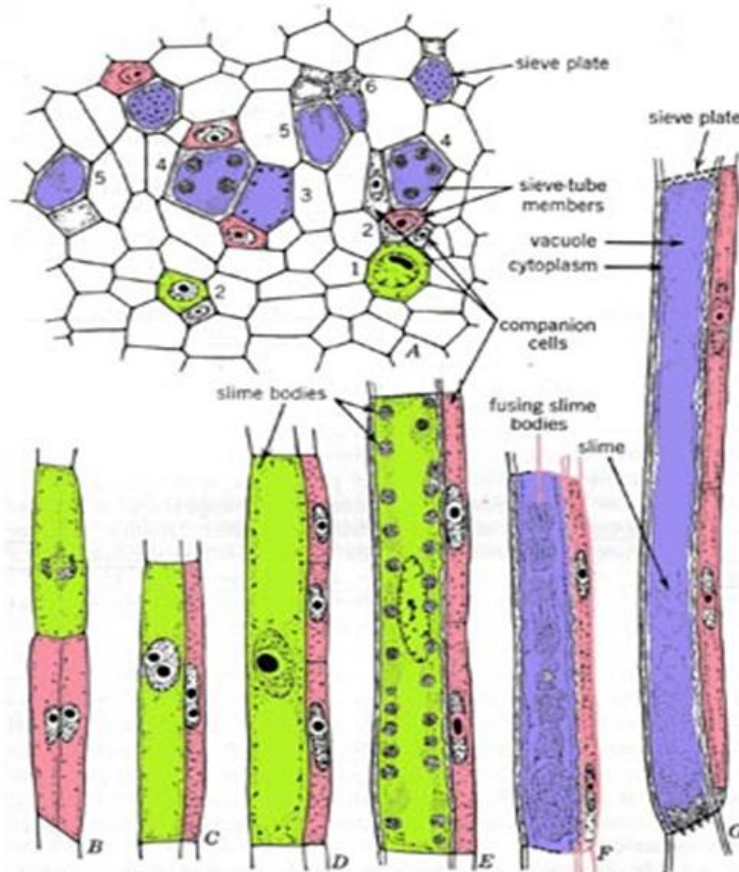


Figura 6. Sistema vascular en plantas. (Taiz y Zeiger, 2002)



El tejido vascular en angiospermas se diferencia a partir de células de cambium, las cuales sufren una división longitudinal asimétrica para posteriormente, en maduración perder el núcleo y dar lugar al tubo criboso (Esau, 1953).

## Desarrollo del floema en angiospermas



Modificado de Esau, 1953.

Figura 7 Tejido vascular de plantas superiores. Esquema superior, corte transversal de un haz vascular. Inferior, (B) División longitudinal de células de cambium y (c) crecimiento asimétrico. Fragmentación de núcleo (D) y su desaparición (E). Acumulación de cuerpos mucilaginosos (F) y perforación de placa cribosa en un tubo funcional (G).

El floema es el tejido por el que el carbono fijado es distribuido en plantas, de hojas fotosintéticamente activas a tejidos heterotróficos. Consta fundamentalmente de dos tipos celulares, la célula acompañante (CA) y el elemento criboso (EC) que están interconectadas por medio de plasmodesmos modificados (Fig. 8) (León Ramírez *et al*, 2003). Estos parecen permitir el movimiento de moléculas de hasta 30kD entre ambos tipos celulares; en contraste, los plasmodesmos interconectando las células de mesófilo tienen un límite de exclusión de 1kD, aproximadamente. Los plasmodesmos son nanocanales citoplásmicos que contienen una forma del retículo endoplásmico apesado que interconectan virtualmente todas las células vegetales a través de su membrana y continuidad citoplásmica, con excepción de las células guarda. Permiten el paso de pequeñas moléculas como iones, hormonas, fotosintatos y otros nutrientes. Está bien documentado que el sistema de tráfico plasmodemal es esencial para la comunicación intercelular mediada por macromoléculas endógenas tales como proteínas NCAP (non-cell autonomous proteins), señales silenciadoras de ARN y ARN mensajeros (Lucas *et al.*, 1995; Perbal *et al.*, 1996; Ishiwatari *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002; Dunoyer *et al.*, 2005; Kurata *et al.*, 2005), lo que sugiere que las plantas han desarrollado mecanismos para el tráfico de señales de desarrollo mediado por células, de célula a célula. En la mayoría de los casos, el plasmodesmo funciona como puertas de enlace para tener un control sobre las señales de movimiento (Kumar *et al*, 2014).

## Plasmodesmos modificados entre CA y TC

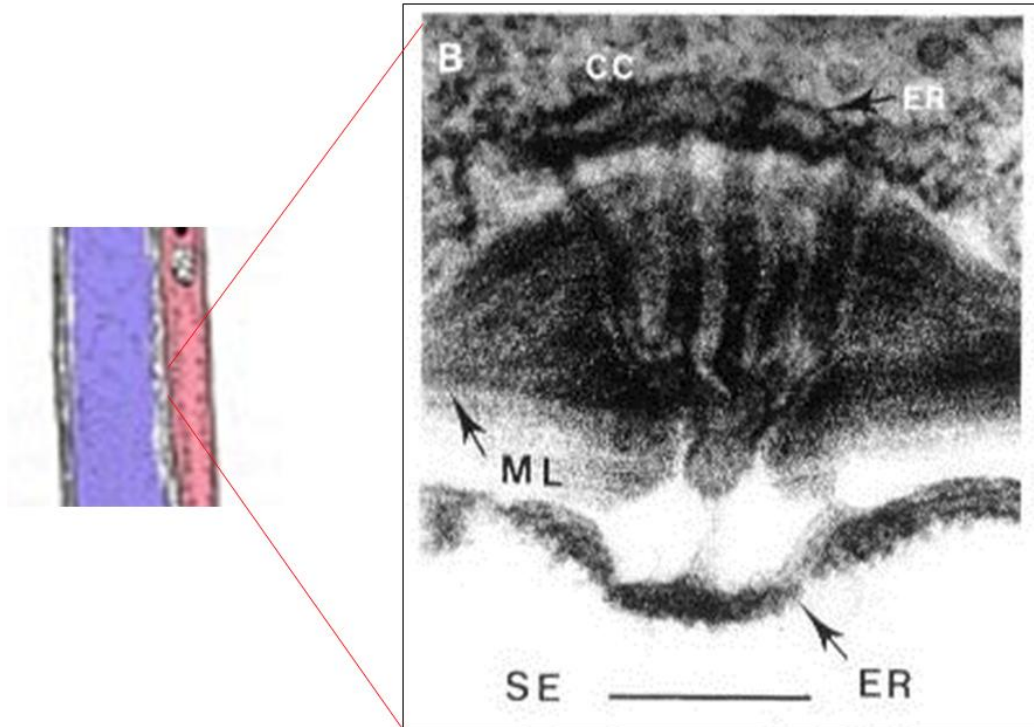


Figura 8. Localización y estructura de un plasmodesmo. Izquierda, representación de un tubo criboso (morado) y una célula acompañante (rosa). Derecha, micrografía de transmisión de un plasmodesmo ramificado presente entre la célula acompañante (CA) y tubo criboso (EC). Nótese el retículo endoplásmico que atraviesa al plasmodesmo.

Se han reportado un gran número de proteínas con capacidad de desplazarse a través de los plasmodesmos, aumentando su límite de exclusión. Algunas de ellas tienen la capacidad de unir a RNA de manera más bien inespecífica (como se mencionará más adelante), mientras que en otros casos se ha demostrado su papel en la comunicación a larga distancia en el fenómeno de inducción floral (como en el caso de la proteína FT)(Lin *et al.*, 2007).

El movimiento de los solutos del floema se debe a una diferencia de presión entre los tejidos fuente y los tejidos consumidores, ya que en éstos los solutos-sobre todo sacarosa y otros azúcares, así como aminoácidos son rápidamente

consumidos, resultando en una entrada de agua en estas células por ósmosis, y la consecuente dilución de los solutos. Por otra parte, existe una mayor acumulación de solutos por fijación de carbono en los tejidos fuente. La interconexión entre ambos tejidos a través del floema es la causa de la ya mencionada diferencia de presión y movimiento de solutos entre tejidos distantes, de manera semejante al modelo propuesto por Münch.

El floema es, asimismo, conducto por el que señales químicas son transportadas entre órganos distantes, involucradas en su comunicación. Dicha comunicación es necesaria para coordinar el crecimiento y desarrollo de plantas vasculares, tanto en respuesta a un programa genético como de estímulos externos. Una gran variedad de fenómenos son producto de dicha comunicación a larga distancia. Ejemplos de éstos son la inducción de la floración, la Resistencia sistémica adquirida, dominancia apical, silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), y otros más recientemente descritos, en particular la recombinación sistémica adquirida en respuesta a estrés.

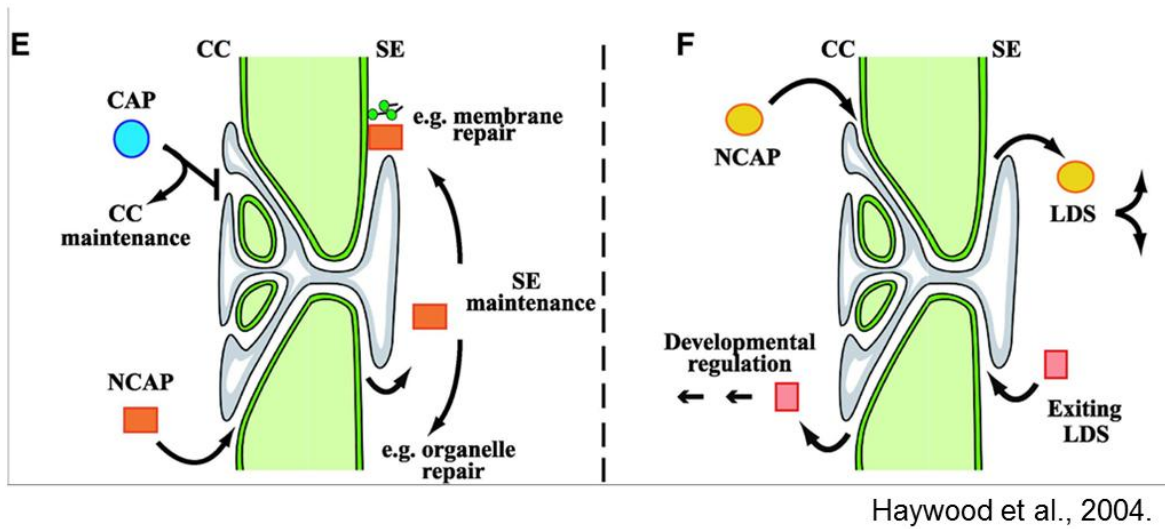
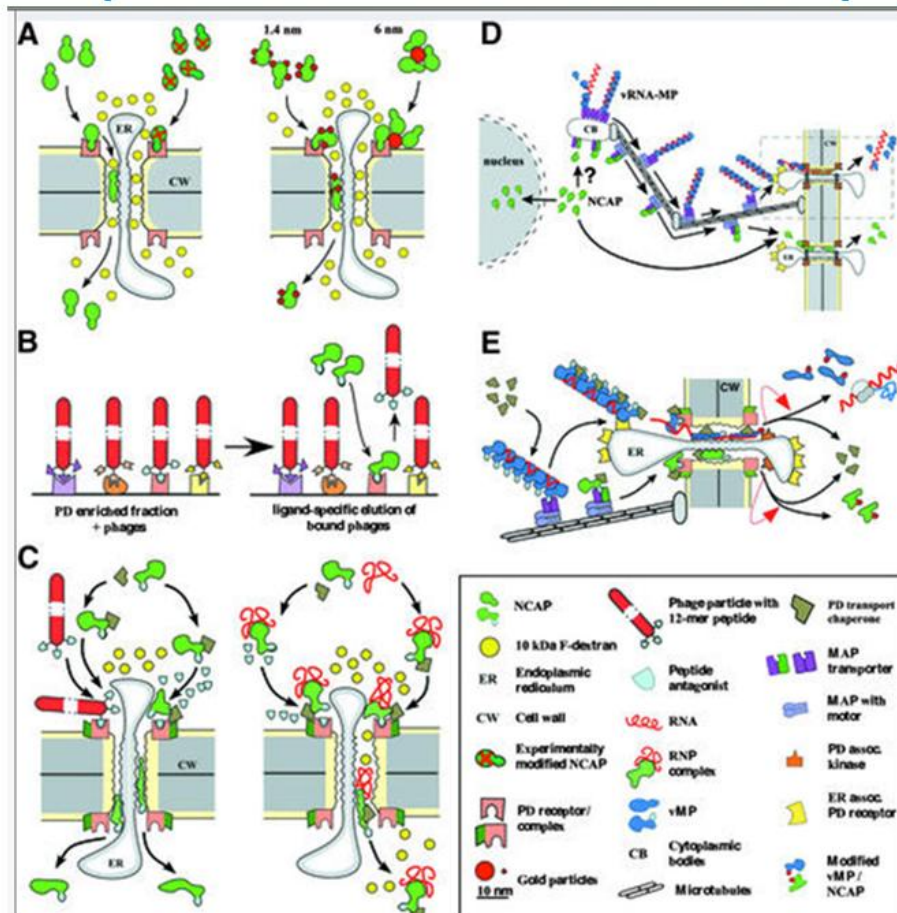


Figura 9. Transporte de macromoléculas, a través de plasmodesmos

Debido a las restricciones espaciales del plasmodesmo, existe un límite de exclusión molecular, como se indicó arriba; sin embargo, la presencia de proteínas de peso molecular superior de uno hasta 250 kD así como de RNAs sugiere que el transporte es altamente selectivo y regulado por mecanismos todavía no claramente conocidos en la entrada del plasmodesmo (Fig. 10).

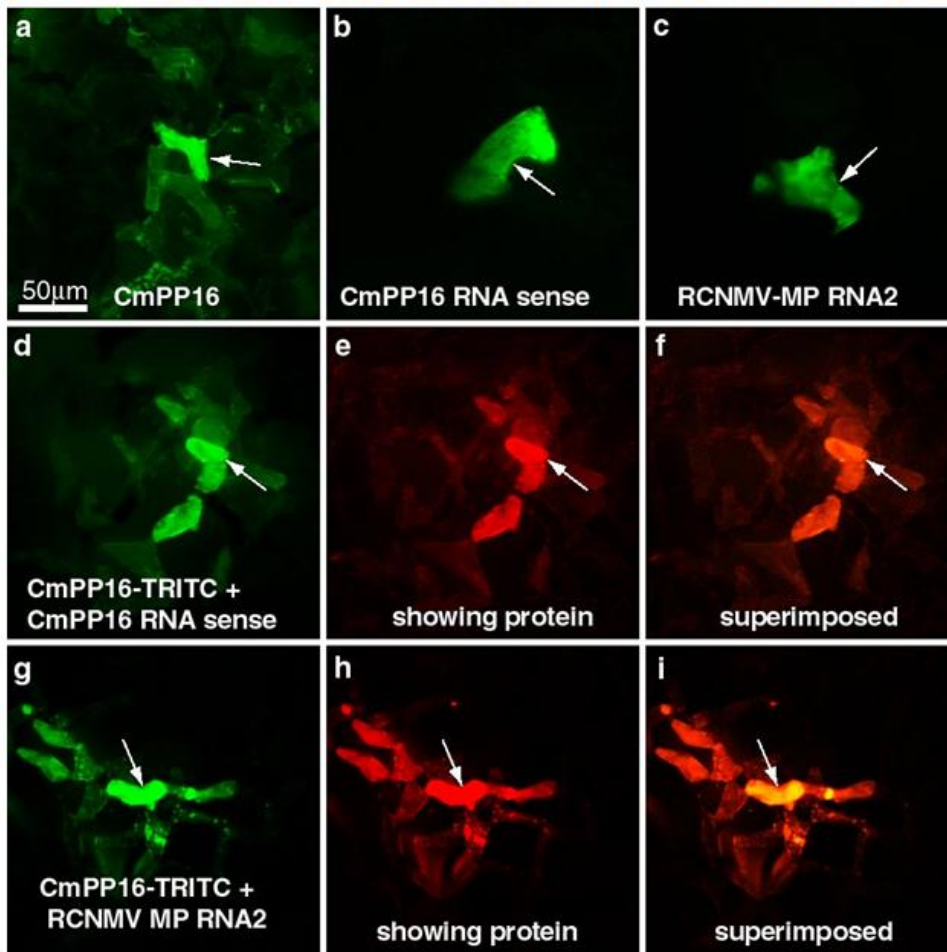


Haywood et al., 2004.

Figura 10 Los mecanismos de transporte de macromoléculas a través del plasmodesmo son complejos. El modelo descrito por Haywood *et al.*, (2004) considera la presencia de moléculas estructurales y facilitadoras de la translocación. Una proteína de reconocimiento de la naturaleza sistémica de moléculas forma un complejo que es reconocido por una proteína anclada al inicio del plasmodesmo (A). Debe existir una gran diversidad de complejos para reconocer a las familias tan diversas en secuencia que son capaces de atravesar esta barrera simplásmica (B). Moléculas tipo chaperonas desdoblan a las proteínas e inician su translocación al tubo criboso (C). El control del sistema es ejercido por el núcleo, que transcribe RNAs codificantes para proteínas de naturaleza supracelular (D). Las moléculas se pliegan después de haber atravesado el plasmodesmo y son a su vez reconocidas por otras moléculas que presumiblemente les indicarán su tejido blanco.

La naturaleza de las señales involucradas se desconoce en su mayoría, aunque en el floema se han encontrado diversas moléculas que podrían constituir tales señales. Cabe mencionar entre ellas fitohormonas y otras moléculas de bajo peso molecular, lípidos, proteínas y una gran diversidad de especies de RNA. Dentro del grupo de trabajo se ha encontrado y caracterizado varias especies de RNAs mensajeros en savia de floema de calabaza que codifican para factores potencialmente involucrados en la regulación del desarrollo de las plantas. Algunos de éstos codifican para factores de transcripción, otros para reguladores de crecimiento y muchos otros para factores cuya función no ha podido ser inferida. Dentro de éstos hay RNAs para varias proteínas con la capacidad de unir RNA. En particular se ha caracterizado con detalle una proteína que une RNA de manera independiente de su secuencia, a la que se ha denominado CmPP16. Esta proteína no solo se asocia a diferentes RNAs in vitro, sino que es capaz de transportarlos de una célula a otra a través de plasmodesmos. Es por tanto funcionalmente semejante a las proteínas de movimiento de virus de RNA, aunque, como ya ha quedado implícito, su función en plantas sanas se desconoce (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999; Xoconostle-Cázares *et al.*, 2016). Evidencia reciente no publicada sugiere que podría estar involucrada en la tolerancia a estrés abiótico.

## CmPP16 se mueve célula-célula y a través del floema



Xoconostle-Cázares et al. (1999) Science 283: 94-98

Figura 11 Evidencia de la capacidad de movimiento de la proteína CmPP16. La proteína fue microinyectada en células del mesófilo de hojas de *Nicotianabenthamiana* y fue capaz de moverse de célula a célula. Cuando la proteína fue acomplejada con RNA, ésta medió el movimiento de RNA a células vecinas. Este trabajo pionero demostró la presencia de un sistema endógeno que tiene la planta sana para translocar proteínas y ácidos nucleicos, mismo que es usado por los virus para moverse sistémicamente.

Homólogos de la proteína CmPP16 se han encontrado en diferentes especies vegetales, aunque su conservación no es tan elevada. Trabajo que se ha



realizado en nuestro laboratorio y en colaboración con el Dr. William Lucas, de la Universidad de California en Davis, indica que CmPP16, fusionada a proteínas de mayor tamaño, no pierde su capacidad de transporte intercelular a través de plasmodesmos. Con base en estos antecedentes, consideramos que CmPP16 puede ser el vehículo para transportar proteínas al interior de los elementos cribosos, a los que normalmente no pueden acceder.

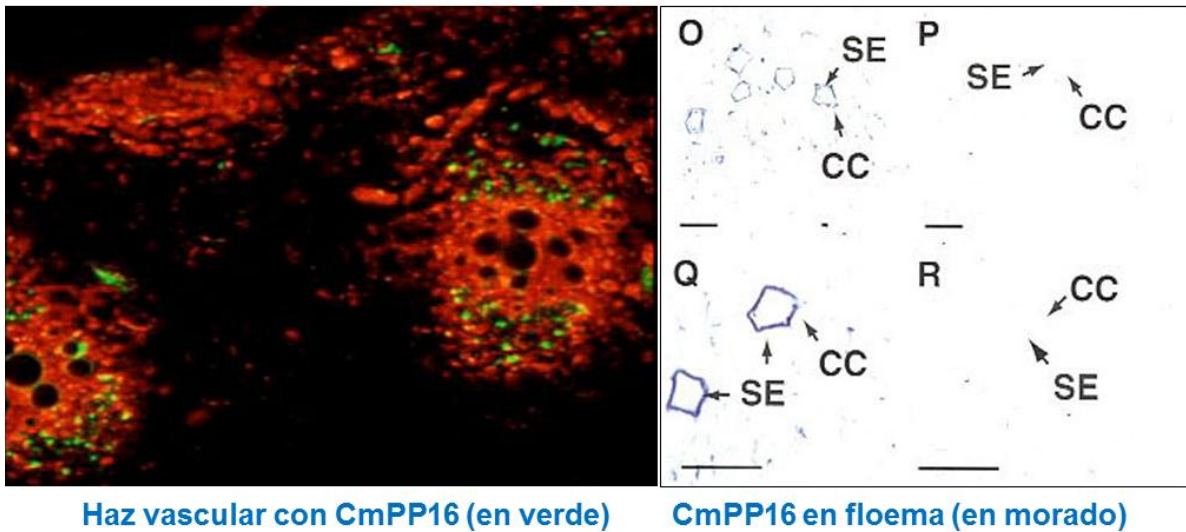
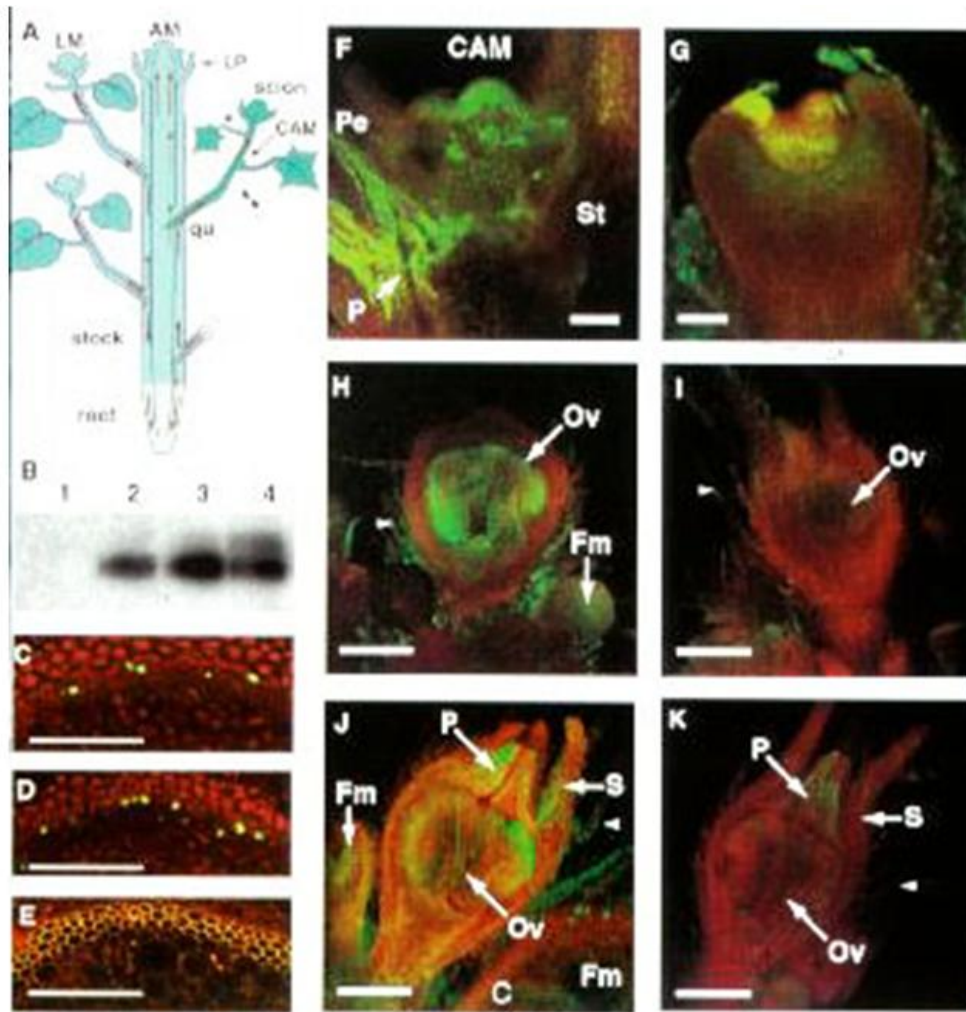


Figura 12 CmPP16 se sintetiza en célula acompañante y viaja a tubo criboso, coincidiendo con el sitio en el cual se desarrolla *Candidatus Liberibacter*.

En la savia de floema circulan también RNAs de diferente naturaleza: mensajeros, de transferencia, ribosomales y microRNAs. La naturaleza sistémica de estas macromoléculas fue descrita por Ruiz-Medrano *et al.*, (1999, 2004) (Fig.13). Estos RNAs están involucrados en señalización de tejidos autótrofos a heterótrofos de mecanismos de respuesta a estrés abiótico, biótico, así como respuestas adaptativas.



(Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

Figura 13. Presencia de transcritos móviles en la savia del floema de calabaza. Los RNA's son capaces de atravesar un heteroinjerto y alcanzar tejidos distantes tales como meristemos florales y vegetativos.

### Principales estrategias utilizadas para el control del HLB

Algunas nuevas tácticas de control como la termoterapia (Hoffman *et al.*, 2013) y la quimioterapia (Hu y Wang, 2016; Zhang *et al.*, 2014) se encuentran en las etapas iniciales de desarrollo, sin embargo, la aplicación en campo se dificulta ya

que los árboles se encuentran expuestos a los insectos vectores de la enfermedad.

Con el objeto de controlar a la enfermedad HLB, diversos autores reportaron un control a través del uso de antibióticos (McManus *et al.*, 2002; Hu y Wang, 2016; Hu *et al.*, 2017). Aunque el resultado de control del agente causal fue una marcada reducción de síntomas, así como una disminución en el contenido de CaLas, su uso no está permitido debido a la fitotoxicidad presentada, y a que el uso de antibióticos en plantas y animales de consumo humano no es aprobado por los organismos de salud (McManus *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2015). La tetraciclina interfiere con la síntesis de proteínas en bacterias, mientras que la penicilina inhibe la síntesis de peptidoglicana, componente estructural de la pared celular de bacterias (Spratt *et al.*, 1988).

Respecto al uso de pesticidas para el control del vector, y la aplicación de antibióticos con el fin de distribuirlos sistémicamente dentro del floema. La limitante, es la continua aplicación de antibióticos, que implica una inversión considerable, mientras que en el segundo debe considerarse la toxicidad y actividad residual de los pesticidas, de acuerdo con expertos de la Universidad de Florida en EE.UU. (ver por ejemplo <http://www.growingproduce.com/>).

Diversas estrategias se han propuesto para el control del agente causal de HLB, entre ellas: La utilización de péptidos antimicrobianos (AMP), inducción de la respuesta inmune innata y uso de RNA de interferencia contra psílidos se ha empleado con resultados limitados.

El mejoramiento convencional para variedades de cultivos resistentes a enfermedades es a menudo un esfuerzo a largo plazo. Es especialmente desafiante para los cultivos arbóreos perennes, como los cítricos con largos períodos de vida juvenil y complejos antecedentes genéticos, lo que resulta en muchos años entre generaciones. Además, la resistencia a HLB que se ha identificado en el conjunto de genes de cítricos está en parientes lejanos, lo que requiere que numerosas generaciones integren esta resistencia en los fenotipos

de mercado. Se ha demostrado que las plantas transgénicas de cítricos que expresan varios genes, incluidos los AMP y los componentes de señalización de la defensa del huésped, mejoran la resistencia al chancro (de Olivera *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2016; Furman *et al.*, 2016 Yang *et al.*, 2011) Sin embargo, solo unos pocos estudios de ingeniería genética han dado como resultado una resistencia relativa al HLB tal como se expresa, al reducir el título de *CaLas* (Hao *et al.*, 2016; Dutt *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2016).

Los AMPs constituyen un mecanismo de defensa ampliamente distribuido en plantas, insectos y vertebrados. Son producidas por diferentes tejidos y células, se clasifican en diferentes familias, de acuerdo con su estructura secundaria. (deFranco *et al.*, 2007). A la fecha existen 3012 péptidos antimicrobianos reportados (bacteriocinas/ antibióticos peptídicos de bacterias, arqueas, protistas, hongos, plantas y animales, incluidos algunos péptidos sintéticos) con la siguiente actividad: antibacterianos; antibióticos, antivirales; anti-VIH, antifúngicos, antiparasitarios; antiproteicos, anticancerosos, antioxidantes, quimiotácticos, insecticidas, Inhibidores de la proteasa, espermicidas, inmovilizadores en la superficie, cicatrizantes (APD, 2018).

La investigación en AMP's ha crecido tanto, que existe una base de datos de péptidos antimicrobianos, llamada APD2 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), en ésta se pueden buscar péptidos de las diferentes familias (bacteriocinas, ciclótidos o defensinas), provenientes de diferentes fuentes como: peces, anfibios, aves o mamíferos. El número de péptidos provenientes de plantas ha crecido logarítmicamente en los últimos años, debido a lo cual éstos tienen otra página exclusivamente dedicada a ellos (PhytAMP). En ambos sitios se puede consultar la actividad de péptidos modificados por amidación, oxidación, lipidación, glucosilación o la presencia de D-aminoácidos, así como la unión a blancos de ataque, como membranas, proteínas, DNA/RNA, LPS o azúcares (Castañeda-Casimiro *et al.*, 2009).

La expresión de estas moléculas ha sido evaluada, sin embargo los resultados no han producido los efectos deseados de control. Nuestro grupo especula que la

falta de acceso de estas moléculas al floema fue la limitante para atravesar la barrera simplásmica y tener acceso a la bacteria causante de HLB.

En contraste, el uso de vectores virales basados en el closterovirus CTV (virus de la tristeza de los cítricos) puede proporcionar un mejor control, ya que este virus está restringido a floema, hábitat de *CaLas*.

Actualmente están en evaluación en Florida contra citrus canker y HLB:

(i) Carrizo citrange con péptido antibacterial de plantas (colaboración de Southern GardensNursery LLC y Texas A&M University).

(ii) Carrizo citrange y toronja con ‘DiseaseBlock’ (virus que expresa proteína antibacterial).

Se ha considerado inducir la expresión de genes de respuesta a patógenos (Baggio *et al.*, 2016), sin embargo, desde el punto de vista comercial no es deseable, ya que las plantas de manera general reducen su productividad en situaciones de estrés.

Estrategias paralelas han considerado el silenciamiento de genes clave en el insecto vector. El RNAi del psílido sería expresado en la planta, al momento de alimentarse de la planta, el RNAi se introduciría al vector, apagando genes esenciales en el insecto y así causando la disminución de su población (Kishk, 2017), sin embargo esto no impediría que la planta adquiriera la bacteria del insecto que se alimenta de ella.

## **β- defensina humana**

Con respecto a patógenos que circulan por el floema, y que normalmente y durante el proceso infeccioso rara vez salen de él, es evidente que una limitante en el tratamiento de enfermedades causadas por estos patógenos es la incapacidad de agentes químicos (por ejemplo, antibióticos) de alcanzar los elementos cribosos que albergan el patógeno. Por lo tanto, una proteína con actividad antibacteriana, en este caso β-defensina humana, fusionada a CsPP16 (proteína homóloga de CmPP16, capaz de transportar diferentes RNAs de una célula a otra a través de plasmodesmos) podría tener acceso al floema, y en particular el elemento criboso.

Los defensinas son miembros de la superfamilia de péptidos antimicrobianos (~4-6 kDa), son pequeños péptidos catiónicos ampliamente distribuidos en todo el reino animal y vegetal secretados en diversas especies, incluidos los humanos y otros mamíferos, pero también peces, aves, insectos, hongos filamentosos, plantas, etc. Esta amplia distribución sugiere que la producción de tales péptidos es un mecanismo antiguo y bien conservado de defensa del huésped (Liu *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008; Suarez-Carmona *et al.*, 2015). Son péptidos catiónicos de defensa (HDP), funcionalmente diversos, alteran las membranas microbianas y actúan como ligandos para el reconocimiento celular y señalización (Stotz *et al.*, 2009).

En la década de 1990, los primeros miembros de la familia de las defensinas vegetales fueron aislados de los granos de trigo y la cebada (Colilla *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 1990). Esas proteínas se llamaba originalmente gamma-tioninas debido a su tamaño (~ 5 kDa, 45 a 54 aminoácidos), el contenido y la cisteína (normalmente 4, 6 u 8 residuos de cisteína) resultaron ser similares a los tioninas (Bruix *et al.*, 1993), posteriores "gamma-tioninas", proteínas homólogas fueron identificados y ADNc fueron clonados a partir de diversas semillas de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas (Broekaert *et al.*, 1995)

En humanos, las defensinas se clasifican en dos subgrupos ( $\alpha$  y  $\beta$ ), en función de las secuencias de aminoácidos únicas y puentes disulfuro. Ambos subgrupos adoptan una conformación molecular relativamente compacta con estructuras rígidas de lámina  $\beta$  que se estabilizan mediante tres enlaces disulfuro intramoleculares. De hecho, las  $\alpha$ -defensinas están unidas por las cisteínas 1-6, 2-4 y 3-5, mientras que los seis residuos de cisteína en las  $\beta$ -defensinas están conectados 1-5, 2-4 y 3-6 (Klotman y Chang, 2006; Selsted y Ouellette 2005; Suarez-Carmona et al., 2015). Aunque estas conectividades disulfuro son esenciales para las actividades quimiotácticas mediadas por CCR2 / CCR6 de defensinas (Wuz et al., 2003), varios estudios demostraron que no son necesarios para sus actividades antimicrobianas (Wuz et al., 2003; Ding et al., 2013).

Todas las defensinas humanas han demostrado la capacidad de ejercer actividades antimicrobianas (muerte y / o inactivación) sobre una amplia variedad de bacterias, virus, hongos y protozoos (Suarez-Carmona et al., 2015). Los mecanismos microbicidas directos de estos efectores catiónicos de inmunidad innata se presumen iniciados por una interacción con las membranas negativamente cargadas de los patógenos (Yeaman y Yount, 2003; Cobo y Chadee, 2013). Las defensinas son capaces de destruir bacterias, ya que tienen una carga positiva, lo que les permite unirse a la membrana celular cargada negativamente, una vez que está dañada, es seguida de fuertes interacciones hidrófobas entre los dominios anfipáticos del péptido y los fosfolípidos de la membrana (Grudlewska et al., 2014; Cytryńska y Zdybicka-Barabas, 2015). Tal unión conduce a alteraciones en gradientes electroquímicos transmembrana, permeabilización de la membrana, formación de canales e incluso fragmentación de la membrana. Para facilitar la penetración de la membrana lipídica, las moléculas del péptido antimicrobiano pueden interactuar entre sí justo antes de la interacción con las moléculas de fosfolípidos de la membrana (Cytryńska y Zdybicka-Barabas, 2015).

Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana revela etapas múltiples después de aproximadamente 3-4 horas después de la unión de las defensinas a la

membrana celular diana. Se han descrito tres formas de transferir defensinas a través de la membrana citoplásmica (Shneider *et al.*, 2005; Witkowska *et al.*, 2008).

El modelo de "duelas" radica en el hecho de que los péptidos se incorporan en la membrana celular de forma perpendicular a su plano de tal forma que las partes interactúan con los lípidos no polares, y la porción hidrófila del péptido forma un hueco a través del cual se filtran los componentes del citoplasma péptidos (Ganz *et al.*, 2003; Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Witkowska *et al.*, 2008).

El segundo mecanismo denominado "de anillo" es la destrucción del modelo de membrana, en el que los péptidos penetran entre dos capas de la membrana, lo que crea un hueco en la cabeza que contiene fosfolípidos y péptidos (Ganz *et al.*, 2003; Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Witkowska *et al.*, 2008).

Otro mecanismo es el modelo "alfombra" caracterizado porque los péptidos no se incorporan en la membrana celular del microorganismo. La porción hidrofóbica de la cadena de aminoácidos de la defensina se combina con las cabezas de fosfolípidos de la membrana con carga negativa. Como resultado de las interacciones electrostáticas de las moléculas de proteínas, pasan a través de las cámaras de la membrana que se reúnen en su interior en una forma similar a una alfombra. Esto causa la tensión de la película, cambiando la disposición de las defensinas en la membrana y la formación de poros en las mismas a través de los cuales fluyen hacia los componentes citoplásmicos de la célula (Ganz *et al.*, 2003; Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Witkowska *et al.*, 2008).

La variabilidad en la composición de fosfolípidos de las membranas bacterianas o envolturas virales podría explicar los efectos antimicrobianos diferenciales de las defensinas que se han destacado en numerosos estudios. En humanos las bicapas de lípidos que forman las membranas serían eléctricamente neutras, por lo tanto, protegerían eficazmente las células del huésped contra la citotoxicidad inducida por defensinas (Yeaman y Yount, 2003; Cobo y Chadee, 2013). Después de la interacción electrostática inicial, las defensinas se acumulan en la membrana



de los microbios y causan la despolarización que finalmente induciría un metabolismo alterado y la muerte (Suarez-Carmona *et al.*, 2015).

Además, las defensinas usan su capacidad de agregarse para formar poros/canales que estimulan la permeabilización de la membrana. Las defensinas también pueden inactivar patógenos o prevenir su internalización celular al interactuar con glicoproteínas de membrana, como se ha descrito principalmente en el contexto del VIH (Wang *et al.*, 2004).

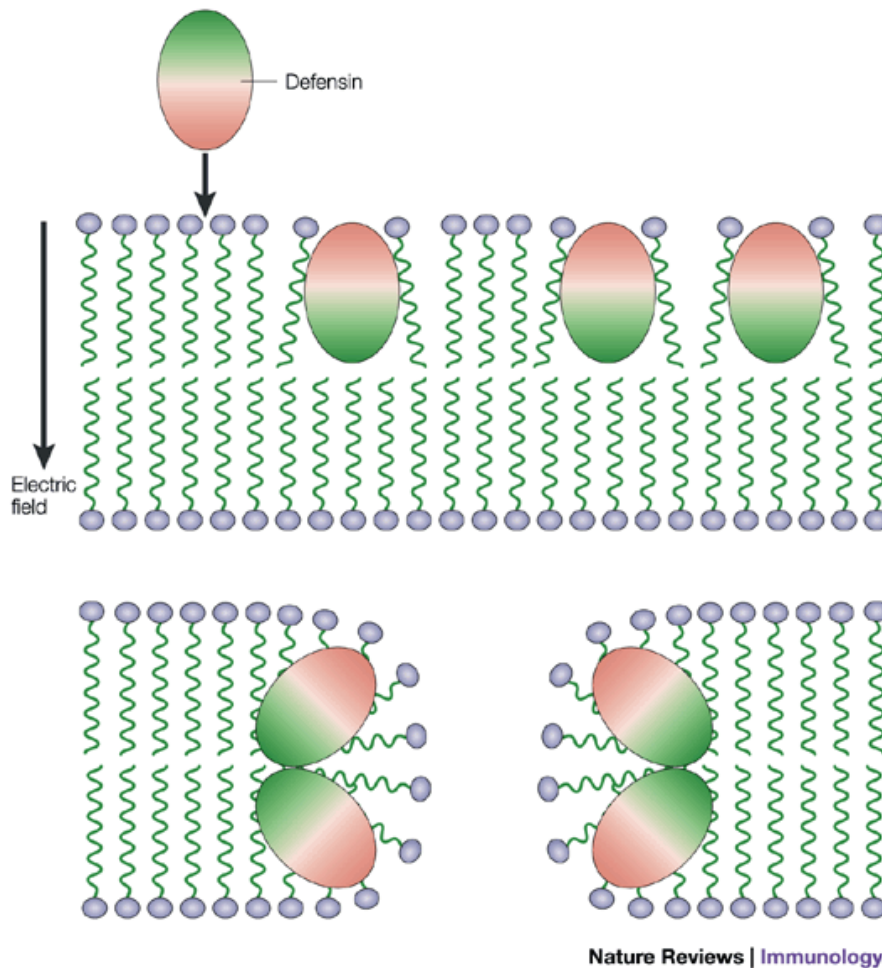


Figura 14 El modelo de alfombras-agujero de gusano de acción de defensinas. La mayoría de las defensinas (mostrados como óvalos grandes) son moléculas anfipáticas que tienen grupos cargados positivamente de las cadenas laterales de amino-ácidos (rosa) e hidrofóbicas cadenas de aminoácidos laterales (verde). Esto les permite interactuar con las membranas microbianas, que se muestran esquemáticamente con sus grupos de cabeza de fosfolípidos cargados negativamente (morado) y cadenas de ácido graso hidrofobos (verde) Son moléculas anfipáticas esto les permite interactuar con las membranas microbianas, la atracción electrostática y el campo de transmembrana bioeléctrica tira de las moléculas de péptidos hacia la superficie y hacia dentro de la membrana. Como las moléculas de péptidos se acumulan en una 'alfombra', la membrana se cuele y la transición péptidos en otra disposición (mostrada en el panel inferior) que reduce la tensión, dando como resultado la formación de "agujeros de gusano de la membrana o poros" (Ganz, 2003).

A diferencia de las defensinas de insectos y de mamíferos, que son principalmente activos contra bacterias (Lay y Anderson 2005; Wong *et al.*, 2007), las defensinas vegetales (Thomma *et al.*, 2002; Wong y Ng 2005), con pocas excepciones, no tienen actividad antibacteriana (Osborne *et al.*, 1995). La mayoría de las defensinas vegetales están implicados en la defensa contra una amplia gama de hongos (Thevissen *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 2002; Lay y Anderson 2005; Wong *et al.*, 2007).

La  $\beta$ -defensina 2 humana (HBD-2) es producida por células epiteliales, encontrándose también presente en mucosa oral y glándulas salivares (Mathews *et al.*, 1999). Exhibe una potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas. Se ha especulado que la  $\beta$ -defensina 2 puede contribuir a la infrecuencia de infecciones Gram-negativas en la piel y el tejido pulmonar. Representa la primera defensina humana que se produce después de la estimulación de células epiteliales por contacto con microorganismos. El gen y la proteína HBD-2 se expresan localmente en queratinocitos asociados con lesiones cutáneas inflamatorias. Es intrigante especular que HBD-2 es un componente dinámico del sistema de defensa epitelial local de la piel y el tracto respiratorio que desempeña un papel para proteger las superficies de infecciones y proporciona una posible razón por la cual las infecciones de piel y pulmón con bacterias Gram-negativas es más bien raro (Schröder y Harder, 1999; Soto *et al.*, 2007).

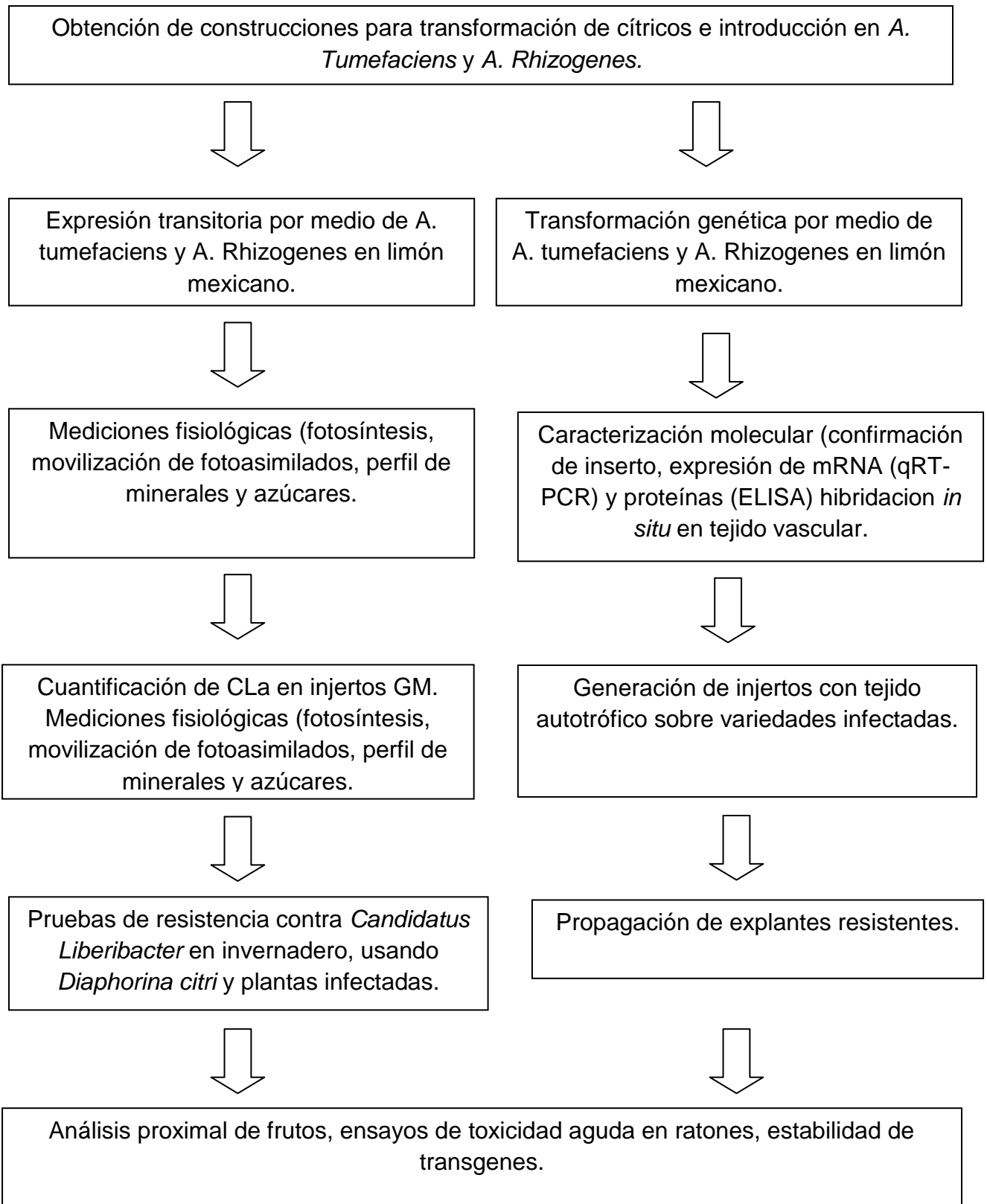
## **HIPOTESIS**

La expresión de una fusión proteica conteniendo CsPP16 y  $\beta$ -defensina 2 en floema proporcionará resistencia contra la enfermedad huanglongbing en cítricos, y además contribuirá a eliminar a la bacteria causante en plantas ya infectadas.

## **OBJETIVO**

Obtención de limón mexicano expresando defensina en fusión traduccional con la proteína CmPP16, para movilizar la defensina al tejido vascular donde se aloja la bacteria causante de HLB.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Obtención de construcciones para transformación de cítricos e introducción en *A. Tumefaciens* y *A. Rhizogenes*.**

En base a la literatura se seleccionaron péptidos con actividad antimicrobiana probada en otros sistemas. Se eligió a  $\beta$ -defensina humana, debido a que los cítricos serán para consumo humano y estos cítricos, al estar expresando un gen presente naturalmente en la superficie de células epiteliales en humanos, no generarán problemas inmunes en los consumidores.

Las secuencias de los péptidos antimicrobianos fueron obtenidas de la base de datos del Genbank (NCBI) y su secuencia de aminoácidos se transformó a secuencia de bases con el uso de codones más común en cítricos para su expresión.

Abajo se indica la lista de uso común de codones disponibles para cítricos en la base de datos: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

Indian citrus ringspot virus [gbvrl]: 12

Citrus sinensis x Poncirustrifoliata [gbpln]: 3

Citrus natsudaikai [gbpln]: 1

Citrus leaf blotch virus [gbvrl]: 3

mitochondrion Citrus junos [gbpln]: 1

Citrus junos [gbpln]: 7

Citrus sinensis x Citrus reticulata [gbpln]: 1

Citrus aurantiifolia [gbpln]: 1

Citrus latipes [gbpln]: 1

Citrus hystrix [gbpln]: 1

Microcitrus sp. citruspark01 [gbpln]: 1

Citrus hybrid cultivar [gbpln]: 1

Citrus yellow mosaic virus [gbvrl]: 6

Citrus limon [gbpln]: 11

Chloroplast Citrus sinensis [gbpln]: 89

Citrus sinensis [gbpln]: 116

Citrus macrophylla [gbpln]: 2

Citrus sudden death-associated virus [gbvrl]: 4

Citrus tristeza virus [gbvrl]: 476

Citrus idaeovirus [gbvrl]: 1

Citrus tatter leaf virus [gbvrl]: 3

Cytoplasmic citrus leprosis virus [gbvrl]: 18

Citrus leaf rugose virus [gbvrl]: 4

Citrus variegation virus [gbvrl]: 17

Citrus maxima [gbpln]: 8

Citrus x paradisi [gbpln]: 28

Citrus kinokuni [gbpln]: 1

Citrus cv. Shiranuhi [gbpln]: 12

Citrus unshiu [gbpln]: 64

Mitochondrion Citrus jambhiri [gbpln]: 1

Citrus jambhiri [gbpln]: 15

Citrus psorosis virus [gbvrl]: 9

Citrus cv. Sainumphung [gbpln]: 5

Citrus iyo [gbpln]: 2

Citrus reticulata [gbpln]: 3

Citrus clementina [gbpln]: 4

Citrus ringspot virus [gbvrl]: 1

Citrus clementina x Citrus reticulata [gbpln]

Abajo se muestra la tabla empleada para cambiar el uso de codones:

<i>Citrus sinensis x Citrus reticulata</i> [gbpln]: 1 CDS's (354 codons)															
fields: [triplet] [frequency: <b>per thousand</b> ] ([number])															
UUU	19.8	(	7)	UCU	14.1	(	5)	UAU	22.6	(	8)	UGU	5.6	(	2)
UUC	19.8	(	7)	UCC	8.5	(	3)	UAC	16.9	(	6)	UGC	8.5	(	3)
UUA	2.8	(	1)	UCA	14.1	(	5)	UAA	0.0	(	0)	UGA	0.0	(	0)
UUG	22.6	(	8)	UCG	2.8	(	1)	UAG	2.8	(	1)	UGG	8.5	(	3)
CUU	22.6	(	8)	CCU	14.1	(	5)	CAU	28.2	(	10)	CGU	2.8	(	1)
CUC	16.9	(	6)	CCC	14.1	(	5)	CAC	2.8	(	1)	CGC	0.0	(	0)
CUA	16.9	(	6)	CCA	19.8	(	7)	CAA	28.2	(	10)	CGA	2.8	(	1)
CUG	19.8	(	7)	CCG	0.0	(	0)	CAG	5.6	(	2)	CGG	5.6	(	2)
AUU	42.4	(	15)	ACU	8.5	(	3)	AAU	25.4	(	9)	AGU	16.9	(	6)
AUC	19.8	(	7)	ACC	11.3	(	4)	AAC	16.9	(	6)	AGC	19.8	(	7)
AUA	8.5	(	3)	ACA	14.1	(	5)	AAA	25.4	(	9)	AGA	8.5	(	3)
AUG	42.4	(	15)	ACG	2.8	(	1)	AAG	42.4	(	15)	AGG	5.6	(	2)
GUU	33.9	(	12)	GCU	22.6	(	8)	GAU	36.7	(	13)	GGU	36.7	(	13)
GUC	11.3	(	4)	GCC	19.8	(	7)	GAC	25.4	(	9)	GGC	14.1	(	5)
GUA	11.3	(	4)	GCA	14.1	(	5)	GAA	28.2	(	10)	GGA	22.6	(	8)
GUG	14.1	(	5)	GCG	2.8	(	1)	GAG	19.8	(	7)	GGG	5.6	(	2)
Coding GC 43.22% 1st letter GC 51.98% 2nd letter GC 34.75% 3rd letter GC 42.94%															

Fig. 15 Frecuencia de codones en cítricos. (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=136400>)



Una vez obtenidos la secuencia del gen, a éste se agregó la secuencia de la proteína translocadora en cítricos CsPP16, unida por una “bisagra” que permite el plegamiento independiente de ambas proteínas. A la secuencia de la construcción sintética se agregaron las secuencias regulatorias; promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador NOS (Ver Anexo 1). Ambas secuencias no están protegidas por derechos de patente.

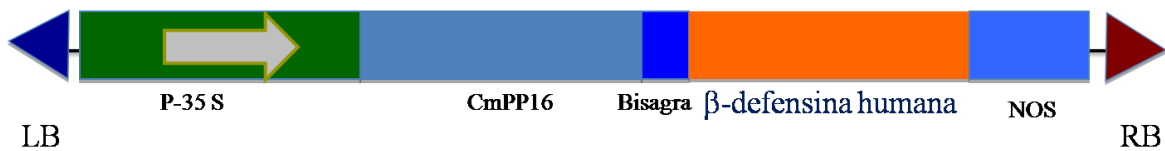


Figura 16. Representación esquemática de la construcción genética utilizada.

### **Clonación del plásmido en *Escherichia coli* y transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes***

Esta secuencia se clonó en el vector pUC57 de la compañía Genscript que contiene resistencia al antibiótico ampicilina (Anexo 2). El plásmido recombinante fue clonado en células competentes de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) mediante choque térmico. En resumen: a los viales con células competentes de *E. coli* se les adicionó 2  $\mu$ l del plásmido y se mantuvieron en hielo durante 20 min, posteriormente, las células fueron sometidas a un choque térmico incubándolas a 42 °C durante 53 s y trasladándolas inmediatamente después a hielo, donde se les adicionó 250  $\mu$ l de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) incubando durante 1-2 horas a 37°C en agitación constante. La suspensión fue esparcida uniformemente en cajas petri conteniendo medio LB sólido suplementado con carbenicilina (100  $\mu$ g/ml). Las cajas fueron incubadas a 37°C toda la noche para posteriormente seleccionar las colonias (Sambrook *et al.*, 2001) y realizar la extracción del plásmido clonado.

Para la extracción del plásmido se continuó con el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 2001, que a continuación se resume: las colonias seleccionadas fueron cultivadas en 3 ml de medio TB (“Terrific Broth”; triptona 1.2%, extracto de levadura 2.4%, glicerol 4 mL/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 72 mM) con 100 µg/ml de carbenicilina durante 16 h a 37°C en agitación constante (200 rpm). Las células fueron compactadas por centrifugación a 13 000 rpm durante 1 min a 4°C, eliminando el sobrenadante por decantación. La pastilla fue resuspendida en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), añadiendo, a esa suspensión 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) incubando en hielo durante 10-15 min (aprox.) para permitir la lisis celular. Después de la incubación, se adicionaron 150 µl de solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 11%), se mezcló por inmersión y se incubó la mezcla por 5 min adicionales en hielo. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante (sin restos celulares) a un tubo Eppendorf limpio. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, mezclando ligeramente, para después mantener el tubo a -20 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 250 µl de etanol al 70% en dos ocasiones. La pastilla se secó a temperatura ambiente y el material fue resuspendido en 32 µl de agua bidestilada estéril. Se agregó 1 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 h. El material se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **Confirmación de inserto.**

Para confirmar la presencia del plásmido de interés, se realizó una PCR a las muestras obtenidas en el paso anterior, utilizando los oligonucleótidos DEF forward 5' –ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTCAGC-3' DEF reverse 5'-CTACTTCTTCTTGCAGCATCTTGTACC-3' para amplificar un fragmento de 180pb en un termociclador Biometra (TGradient 96) y los siguientes reactivos en un volumen final de 12.5µL.

Componente	Volumen
Buffer 10X	1.25
MgCl <sub>2</sub> 20X	0.662
dNTP's 2.5 Mm	1.0
Oligo Forward DEF	0.5
Oligo Reverso DEF	0.5
Taq polimerasa	0.4
DNA plasmídico (50ng/μL)	1.0
Agua	(llevar a 12.5)

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Proceso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	
Desnaturalización	94°C	35 segundos	} 30 ciclos
Alineamiento	60°C	15 segundos	
Extensión	72°C	35 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	

El producto se corrió en un gel de agarosa al 1.2% en cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 5X. El gel se colocó en solución de bomuro de etidio 1:1000, para su visualización en transiluminador de luz UV.

Los plásmidos clonados se utilizaron para la transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) o *Agrobacterium*

*rhizogenes* (K599). Agregando 1-2 µl de plásmido al vial con las células competentes (manteniéndolo en hielo), el volumen completo del vial se mezcló con cuidado y se transfirió a la celda de electroporación de 1 ml (la cual se mantuvo en hielo durante 15 min antes de la transformación), colocando ésta dentro del electroporador para realizar el choque eléctrico (1800 mV). Inmediatamente se agregaron 500-1000 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) a la celda de electroporación, y se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf estéril para incubarla durante 2-3 h a 28°C. Finalmente, transcurrido este tiempo, se inocularon placas con medio sólido YEB adicionado con carbenicilina (100 µg/µl), las cuales fueron incubadas a 28°C durante 48 horas (aprox.) para obtener clonas candidatas de *Agrobacterium tumefaciens* y *rhizogenes* conteniendo la construcción deseada.

Se confirmó la presencia del vector realizando la extracción de DNA de la bacteria, la amplificación por PCR y la visualización en transiluminador UV después de correr el producto en gel de agarosa de acuerdo a detallado para *E. coli*.

Las cepas transformadas de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* fueron utilizadas para realizar la expresión transitoria y transformación por medio de *A. tumefaciens* y *A. Rhizogenes* en limón mexicano.

### **Transformación por medio de *A. tumefaciens* y *A. Rhizogenes* de explantes de limón mexicano.**

#### **Germinación *in vitro* de semillas obtenidas a partir de limón mexicano**

Las semillas fueron extraídas de frutos maduros aparentemente sanos de Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle), la desinfección de las semillas se realizó en solución de hipoclorito de sodio (10%) con Tween 20 (0.1%) durante 15 minutos, posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua estéril, puestas a secar a temperatura ambiente (24 h). El tegumento de las semillas fue removido y fueron

sembradas en tubos de ensayo (25 mL) conteniendo 5 mL de medio de cultivo MS solidificado con Gel-rite (1.25 g/mL) ajustado con KOH (1M) a pH 5.8. El cultivo fue incubado a 24 °C en obscuridad por 15 días seguidos de 1 semana en fotoperiodo de 16 h luz por 8h de obscuridad a 25°C, regresadas a cámara oscura por 15 días, finalmente colocadas nuevamente en fotoperiodo 1 semana (Fig. 17). Posteriormente, las plántulas se utilizaron como fuente de explantes para experimentos de transformación genética.

### **Preparación de *A. tumefaciens* y *A. Rhizogenes* para transformación.**

Las cepas fueron cultivadas en medio LB que contiene 100 mg/L de carbenicilina durante 48 h en agitación horizontal a 28 ° C siguiendo el protocolo descrito por Cervera et al., (2004). Las células bacterianas se centrifugaron a 4000 X g durante 10 min, se resuspendieron y se diluyeron a  $4 \times 10^7$  células/mL en medio de inoculación (IM), que consiste en sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) (Fig. 17).

### **Transformación de explantes**

Explantes (0.8-1 cm) de plántulas germinadas *in vitro* fueron inoculadas por inmersión en el medio de inoculación por 5 min, posteriormente los explantes se secaron en papel filtro estéril y fueron transferidos a medio de co-cultivo (CM) (Cervera et al., 2004), que consiste en medio MS adicionado con 1 µg/L ácido indolacético, 1 µg/L de 2-isopentiladenina, 1 µg/L de 2,4-ácido diclorofenoacético (2,4-D) y 8 g/L de agar ajustado con KOH (1M) a pH 5.8, en el que se mantuvieron por 48h a 24°C. Después del periodo de co-cultivo, los explantes fueron transferidos a medio de regeneración SRM (Cervera et al., 2005), medio MS suplementado con BAP 7 µg/L (6-benzylaminopurina), vancomicina (50 mg/L) y cefotaxima (100 mg/L) ajustado con KOH (1M) a pH 5.8. Los cultivos fueron

incubados en oscuridad (24°C) por 4 semanas y después fueron puestas en fotoperiodo 16h luz por 8h de oscuridad a 25°C, hasta ser injertadas (Fig 17).

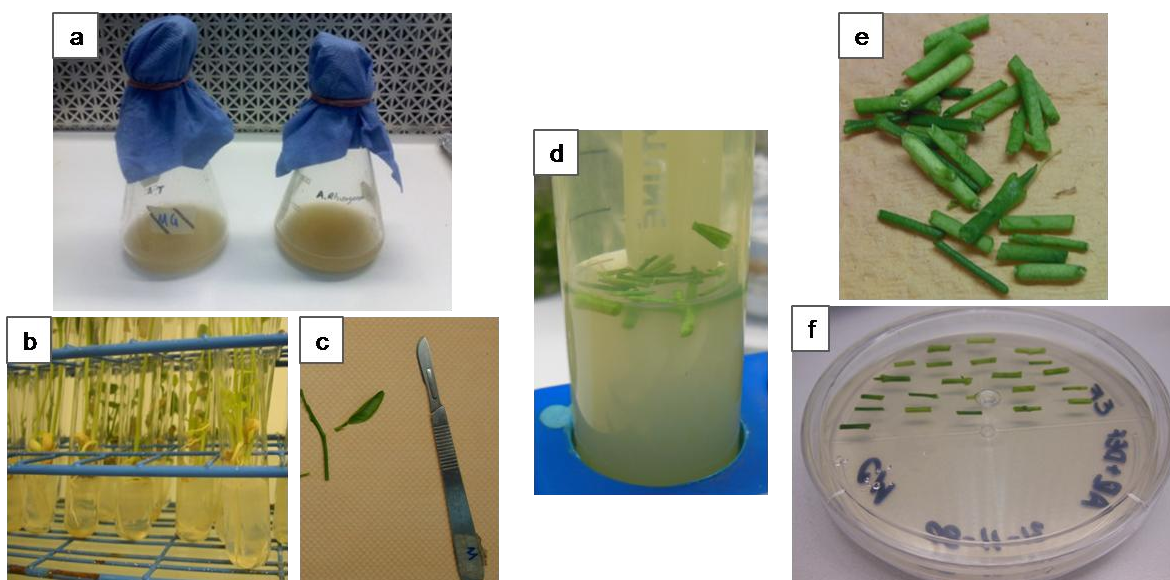


Fig. 17. Transformación de explantes. a) preparación de *Agrobacterium*, b) germinación de semillas, c) obtención de explantes, d) inmersión en medio de inoculación, e) eliminación de exceso de medio, f) medio de cocultivo.

### Propagación de explantes transformados

La propagación de los explantes transformados se realizó en invernaderos de bioseguridad del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica) Querétaro. Se utilizaron dos métodos de propagación, dependiendo del tamaño del injerto. El primer método fue injertación directa del explante, con el denominado injerto de yema en T, utilizando explantes regenerados mayores a 1cm. El segundo método fue micropropagación sobre patrones de aproximadamente 4 semanas de desarrollo (10cm) obtenidos de semillas germinadas *in vitro* a los cuales se les remueve el meristemo apical y se les coloca el meristemo apical del explante (1mm); una vez que se desarrollaron durante 2 meses, se procedió a realizar el injerto de yema en T.

Los injertos se realizaron sobre plantas certificadas, libres de plagas y enfermedades de seis meses de desarrollo, fueron realizados en verano, ya que es cuando la corteza del patrón se puede despegar con facilidad, el árbol está en crecimiento activo, así como el flujo de savia.

Para realizar el injerto de yema en T se realizó un corte vertical de 2-3 cm. y luego otro horizontal en forma de "T" en la corteza de la planta donde se realizó el injerto, procurando que el corte no llegue a penetrar en la madera y sólo afecte a la corteza. Luego se despegó la corteza con el bisturí y se insertó el explante hasta emparejar los 2 cortes horizontales, los tejidos, denominados cambium, del injerto, y de la planta patrón, se ponen en contacto en estos cortes horizontales. Para que no se abriera la corteza y se secase el explante, fue necesario mantener cerrado el corte, para ello se utilizó cinta de injertar, de material plástico y que tensa y asegura firmemente el injerto, cinta plástica transparente o rafia. Se enrolló por debajo del corte y se fue subiendo, procurando dejar al descubierto el explante. Se desató a los 15 ó 20 días aproximadamente cuando el injerto "ha pegado" mostrando signos de desarrollo. Cuando el injerto comenzó a emitir brotes, se cortó el tallo del portainjertos por encima del sitio donde se encuentra el injerto, procurando que de esta manera los nutrientes alimentaran solo al explante (Fig. 18).

Se dejó crecer 4 meses para tomar muestras de tejido y confirmar la transformación genética, la expresión del transgén, así como la expresión del péptido antimicrobiano en tejido. Las plantas regeneradas fueron mantenidas en condiciones de invernadero, a lo largo del estudio.

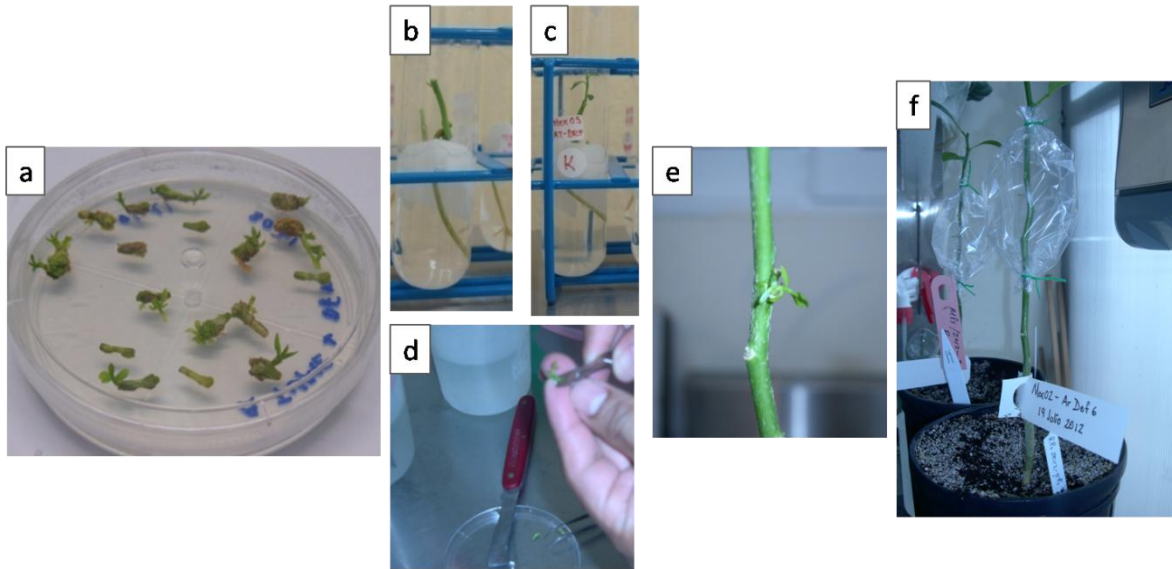


Figura 18. Propagación de explantes mediante injerto. a) explantes regenerados, b) microinjertos, c) regeneración de microinjerto, d) obtención de injerto directo, e) injerto en T, f) regeneración

### **Análisis de DNA genómico en injertos regenerados**

Para el análisis se realizaron 2 muestreos, a los 120, y 180 días tomando muestras de hojas, las cuales se almacenaron a 4°C hasta realizar la extracción de DNA, para la cual, se eliminaron las nervaduras centrales de las hojas, utilizando posteriormente el protocolo y el Kit de extracción: DNeasy extraction Plant Mini kit (Qiagen). Se midió la concentración de DNA obtenido de cada una de las muestras y se llevaron a una concentración de 100ng/μL.

Se realizó PCR punto final con las condiciones antes mencionadas, para verificar o descartar la presencia del transgen. El producto obtenido se corrió en gel de agarosa, realizando electroforesis y visualizando en transiluminador UV (Fig. 25).



## **Análisis de expresión del transgén**

Se analizó la expresión del transgén mediante rt-PCR y rt-qPCR para lo cual se realizaron muestreos de las plantas positivas en análisis de DNA, tomando muestras de hojas y almacenándolas inmediatamente en hielo seco, para continuar con el protocolo de extracción de RNA utilizando kit RNeasy Qiagen. Se midió la concentración de RNA obtenido de cada una de las muestras y se llevaron a una concentración de 100ng/μL. De las extracciones se tomaron muestras y éstas se corrieron en electroforesis en gel de agarosa para visualizar la integridad del RNA en transiluminador UV y su uso posterior.

La rt-PCR se realizó en termociclador (Biometra TGradient 96), para la cual, se utilizó el kit OneStep-qRT KAPA preparando las mezclas de reacción siguiendo las especificaciones del proveedor y los oligonucleótidos (DEF 5' y DEF 3') utilizados en el análisis de DNA .

Posteriormente las muestras fueron analizadas por rt-qPCR, que se llevó a cabo en los equipos: RG-3000 (Corbett Research, Australia) y en equipo StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA) utilizando los oligonucleótidos marcados qDEF5' 5'-TATGCCACTTCCAGGTGTTT-3', qDEF3' 5'-AAACTGGATGGCAAATAGCAC-3' además de oligonucleótidos marcados para el gen endógeno COX (*C. Sinensis*) qCOX5' 5'-GTATGCCACGTCGCATTCCAGA-3' , qCOX 3' 5'-GCCAAAAGCTGCTAAGGGCATTTC-3' así como el kit OneStep-qRT KAPA preparando las mezclas de reacción siguiendo las especificaciones del proveedor.

Se realizaron tres repeticiones por muestra, incluyendo repetición sin transcriptasa reversa para descartar presencia de contaminación por DNA. Se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001) para relacionar los valores de CT con respecto a los controles (-) WT y (+) DNA plasmídico, homogenizando los valores con el gen endógeno, utilizando el software StepOnePlus (Applied Biosystems).

### **Detección inmunoquímica (Western-blot)**

Para verificar el tamaño esperado de la construcción proteica se realizó extracción de proteína y electroforesis de una dimensión SDS-PAGE, para lo cual, se tomaron muestras de hojas positivas a la expresión del transcrito. El material vegetal se maceró en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se tomó 0,1 g de material vegetal y se le agregó 1 ml de buffer de extracción siguiendo el protocolo descrito por Hinojosa Moya *et al.*, (2013), centrifugando a 10,000 rpm/2 min. La concentración total de proteína fue determinada por espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop 1000TM) y las muestras fueron ajustadas a la misma concentración, para su posterior análisis. Una vez realizada la extracción las muestras fueron mezcladas con Buffer desnaturizante 2X y tratadas térmicamente (90°C/2 min) sometiéndolas a SDS-PAGE (12%) y corriendo a 120 V constantes por aproximadamente 1 hora. Se corrieron dos geles en espejo, uno de los cuales fue teñido con azul de Coomassie, para visualizar las proteínas separadas por peso molecular, determinando éstos por la comparación de la movilidad electroforética de la muestra con el patrón. Para el segundo gel, las proteínas totales fueron transferidas a membranas de polivinilidenofluoruro (PVDF) (WhatmanTM) a 100 V durante una hora. La membrana se incubó dos horas en 5% (p/v) leche descremada (Svelty) disuelta en TBS 1X (Tris Buffer Saline), como solución de bloqueo, seguido de 5 lavados de 20 minutos c/u con TBS 1X, Tween-20 0.1%, e incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal contra  $\beta$ -defensina (Santa Cruz Biotechnology, CA) (dilución 1:2000-TBS 1X, leche descremada 5%). Las membranas fueron lavadas cinco veces durante durante 20 minutos (TBS 1X, 0.1% Tween-20) e incubadas con el anticuerpo secundario IgG acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, CA) con una dilución 1:5000 en TBS 1X, leche descremada 2.5% durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, después de cinco lavados de 20 minutos c/u con TBS 1X, 0.1% Tween-20 la señal fue revelada al agregarse el sustrato NBT/BCIP diluido a una dilución de 1:50, durante 20 minutos, enjuagado nuevamente y almacenado protegido de la luz para su análisis en microscopio.

## **Inmunolocalización en tejido del péptido $\beta$ -defensina**

Para la localización en tejido se

Se realizaron cortes transversales en hojas fijadas en parafina en las cuales se corroboró previamente la presencia del transcrito.

Preparación del tejido

Fijación

Los tejidos frescos fueron sumergidos en solución fijadora FAA (formaldehído 3.7%, ácido acético 5.0% y etanol 50%, preparada en el momento) durante 14 horas (toda la noche). Posteriormente, los tejidos fueron sumergidos por 2 horas, consecutivamente, en alcohol al 30%, 50%, 70% y 90%. El tejido fue sumergido en etanol al 95% con 0.01% de safranina toda la noche. Se realizaron 2 cambios de etanol al 100% por 30 minutos (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

Infiltración y cortes

La infiltración se realizó sumergiendo en soluciones 3:1, 1:1, 1:3, de etanol-citrisolv (Fisher) y citrisolv al 100% toda la noche. Los tejidos se sumergieron en citrisolv por 1 hora y poco a poco fue remplazado por citrisolv fresco. Se adicionaron gránulos de parafina (TissuePrep, Fisher) y se incubó a 42° toda la noche. La mezcla de parafina-citrisolv fue remplazada por parafina líquida, este paso se repitió 3 veces por día durante tres días. Los tejidos fueron orientados en bloques de parafina para lo cual se precalentaron las bases de los moldes (Fisher) sobre una plancha a 55°C, se colocó una gotita de parafina líquida para acomodar sobre ella el tejido de acuerdo con la orientación deseada (corte transversal o longitudinal) y se colocó un anillo de plástico (Fisher) para ser llenado con parafina líquida. La parafina en los moldes se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron a 4°C hasta su uso. Consecutivamente, se hicieron cortes de 5-10 $\mu$ m con un micrótopo rotatorio HM 315 (Microm) y se colocaron sobre laminillas

tratadas con el reactivo vectabond (Vector Laboratories) en acetona al 2% para incubarse toda la noche a 42° sobre una plancha.

#### Hibridación y revelado

Los tejidos fueron desparafinados sumergiendo las laminillas en citrisolv durante 10 minutos. Los tejidos fueron hidratados en un gradiente de alcohol desde 100% durante 2 minutos (dos veces), 90%, 70%, 50% y 30% (con 0.01% de safraninay 0.85% de NaCl) durante 1 minuto. Se hizo un lavado en agua bidestilada estéril, incubando por 10 minutos. Los cortes histológicos se incubaron dos horas en 5% (p/v) leche descremada (Svelty) disuelta en TBS1X, como solución de bloqueo, seguido de 5 lavados de 20 minutos c/u con TBS 1X, Tween-20 0.1%, e incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal contra  $\beta$ -defensina (Santa Cruz Biotechnology, CA) (dilución 1:2000-TBS 1X, leche descremada 5%). Los cortes histológicos fueron lavados cinco veces durante durante 20 minutos (TBS 1X, 0.1% Tween-20) e incubados con el anticuerpo secundario IgG acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, CA) con una dilución 1:5000 en TBS 1X, leche descremada 2.5% durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, después de cinco lavados de 20 minutos c/u con TBS 1X, 0.1% Tween-20 la señal fue revelada al agregarse el sustrato NBT/BCIP diluido a una dilución de 1:50, durante 20 minutos, enjuagado nuevamente almacenado y protegido de la luz para su análisis en microscopio.

## **Expresión transitoria en plantas de limón mexicano infectado con HLB.**

Preparación de *Agrobacterium* para expresión transitoria en plantas.

Las cepas fueron cultivadas en medio LB conteniendo 100 mg/L de carbenicilina durante 48 h en agitación horizontal a 28° C. Las células bacterianas se centrifugaron a 4000 X g durante 10 min, se resuspendieron y se diluyeron a  $4 \times 10^7$  células/mL en medio de inoculación que consiste en sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con BAP.

Las plantas fueron inoculadas al raspar una capa fina del tejido leñoso de los tallos con un bisturí, un algodón conteniendo la solución bacteriana fue depositado sobre la región descubierta. La región tratada se cubrió con plástico y la planta completa se cubrió con una bolsa grande de plástico para mantener elevada humedad y favorecer la generación de tejido transformado como se muestra en la figura 19. El material se retiró a los 7 días posteriores a la transformación.

Se realizaron 3 experimentos con expresión transitoria: el primero utilizando plantas enfermas con síntomas de HLB. Un segundo experimento utilizando plantas sanas provenientes de vivero certificado, las cuales, fueron expuestas a la enfermedad, después de realizarse la expresión transitoria. En ambos casos la presencia de la bacteria se analizó utilizando el método EMA PCR que permite discriminar entre bacterias vivas y muertas (Rudi *et al.*, 2005).



Figura 19. Expresión transitoria. a) Tejido de floema expuesto mediante raspado ligero con bisturí, b) Algodón con solución bacteriana, c) Cobertura de la superficie expuesta con el algodón conteniendo la solución bacteriana, d) planta completa cubierta con bolsa de plástico.

Para el tercer experimento de expresión transitoria se utilizó la construcción genética CsPP16-Defensina unida al gen marcador GFP, para su visualización en microscopía confocal.

## Experimento 1 de expresión transitoria

El Dr. Emiliano Loeza Kuk, investigador del INIFAP campus Mocochoá, desarrolló materiales de cítricos empleando patrones de limón volkameriano e injertó limón mexicano y/o limón persa con síntomas de HLB, y los mantuvo en condiciones de invernadero. Las plantas presentaban síntomas asociados a HLB (Figura 20), y la carga bacteriana de CaLas fue confirmada por PCR en tiempo real, al inicio y durante el experimento con ayuda de la Dra. Ruth Sandoval Luna investigadora del SENASICA en CESVY Mérida. El estudio duró 4 meses, se realizaron muestreos a los 30, 60 y 120 días, analizando en cada uno de ellos, altura, área foliar, taza fotosintética y carga bacteriana.



Figura 20. Aspecto de los síntomas presentes en las plantas empleadas en el ensayo en invernadero.

Se realizó el siguiente diseño experimental en experimento 1

Tratamiento	no. de plantas	no. de inoculaciones
Plantas enfermas con Defensina	5	4
Plantas enfermas con transgen control (GUS).	5	4
Plantas enfermas con inoculación de agua	5	4
Plantas sanas con agua	5	4
Plantas sanas	5	4

### **Experimento 2 de expresión transitoria**

Como se mencionó anteriormente, para el segundo experimento, se utilizaron plantas sanas, las cuales fueron sembradas en macrotúneles en campo, siguiendo las normas de biocontención. El estudio se realizó en “Rancho el Pandelo” ubicado en Tecomán, Colima, la cual, es una zona con alta presencia de HLB. Se realizaron muestreos al inicio del experimento y posteriormente cada dos meses durante un año (Figura 21). En éste estudio se analizaron carga bacteriana y tasa fotosintética.





Figura 21. Macrotúneles para ensayo de expresión transitoria.

Se realizó el siguiente diseño experimental en experimento 2

Tratamiento	no. de plantas	no. de inoculaciones
Plantas con Defensina	10	4
Plantas con inoculación de agua	10	4

### **Tasa fotosintética**

Se midió la tasa fotosintética de las plantas utilizando el equipo IRGA (LI-COR 6400-XT) a irradiación constante, realizando diez mediciones por planta, eligiendo hojas al azar realizando 3 repeticiones por hoja.

### **Altura de plantas y área foliar**

Para medir la altura se utilizó cinta métrica, midiendo desde la base hasta la rama apical. Para el área foliar se escogieron 5 hojas representativas de cada planta. Cada una de las hojas se coloca sobre un papel y se dibuja el contorno recortándolo y pesando. El área se calcula al conocer el peso de un cuadrado de área conocida de ese mismo papel.

El muestreo se realizó a los 30, 60, 120, 180 y 360 días posteriores a la inoculación.

### **Expresión transitoria utilizando la fusión Cspp16-DEF-GFP**

Para los ensayos con GFP se utilizaron plantas sanas en condiciones de invernadero, a las cuales se les inoculó en hojas *Agrobacterium* conteniendo la fusión Cspp 16-Defensina-GFP, utilizando una jeringa 1 ml y aguja hipodérmica (Fig. 22), realizando inoculaciones en el envés de la hoja, en meristemas localizados en la base de la hoja, así como en brotes jóvenes. Para la localización de la proteína mediante microscopía confocal se tomaron las muestras de hojas transformadas y se realizaron cortes transversales con navajas de acero inoxidable especiales para microscopía (Electron Microscopy Sciences™), utilizando un microtomo y realizando cortes de 50 µm. Se efectuó el montaje de los tejidos en glicerol al 50%, entre un portaobjetos y un cubreobjetos (20 x 50 mm) sobrepuestos (Corning) y fijados con esmalte. Las imágenes fueron tomadas en los Microscopios Confocal TCS-SPE y TCSSP8 Marca Leica (Objetivos 20X, 40X, 63X: ACS 1.15 IMMAN), y el Multifotónico TCSSP5/MO-TANDEM Marca Leica (Objetivos 20X y 40X: HCxPLAPO λ-blue IMM UV 0.7 A.N.), el cual posee un Laser Tisaph 200M 2X (resolución: 1024 x 1024 pixeles), utilizando longitudes de excitación de 515nm/580 nm y de detección de 525-550nm/600-680 nm 63 para GFP y la clorofila (auto-florescencia), respectivamente. Finalmente las imágenes fueron tratadas y analizadas con el programa Leica Las AF.



Figura 22. Inoculación de *Agrobacterium* con la construcción CsPP16-DEF-GFP.

## RESULTADOS

### **Clonación del plásmido en *E. coli* y subclonación en *Agrobacterium***

Una vez transformadas las células competentes de *E. coli* para la clonación del plásmido, se verificó la presencia de éste mediante la extracción de DNA y amplificación por PCR del fragmento correspondiente al gen  $\beta$ -defensina, de igual forma se corroboró la presencia del plásmido en las cepas transformadas de *Agrobacterium tumefaciens* y *rhizogenes*.

### **Germinación *in vitro* de semillas de limón mexicano**

Los proceso de germinación *in vitro* duraron 4 semanas aproximadamente para obtener plántulas de alrededor de 10cm con una eficiencia de germinación de aproximadamente 85%, obteniendo alrededor de 8 explantes por plántula y que fueron utilizados para la transformación.

### **Transformación genética**

De los ensayos de transformación genética se obtuvo la regeneración de 220 explantes, con un promedio de regeneración de alrededor de 30% de explantes viables para ser injertados; los cuales fueron llevados a las instalaciones de bioseguridad de la Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal SENASICA ubicado en el Marqués, Querétaro, donde se utilizaron para realizar microinjertos así como “injertación directa” el cual no se encuentra reportado en la literatura. Con éste último método se redujo el tiempo de regeneración por aproximadamente 2 meses (Fig. 23). *Citrus Volkameriana* y *citrange troyer* fueron utilizados como patrones, los cuales fueron generados mediante cultivo *in vitro*, proporcionados por el ingeniero Domingo Colmenares Aragón y con ayuda del ingeniero Jaime Sánchez Hernández se obtuvo la regeneración de 113 injertos.

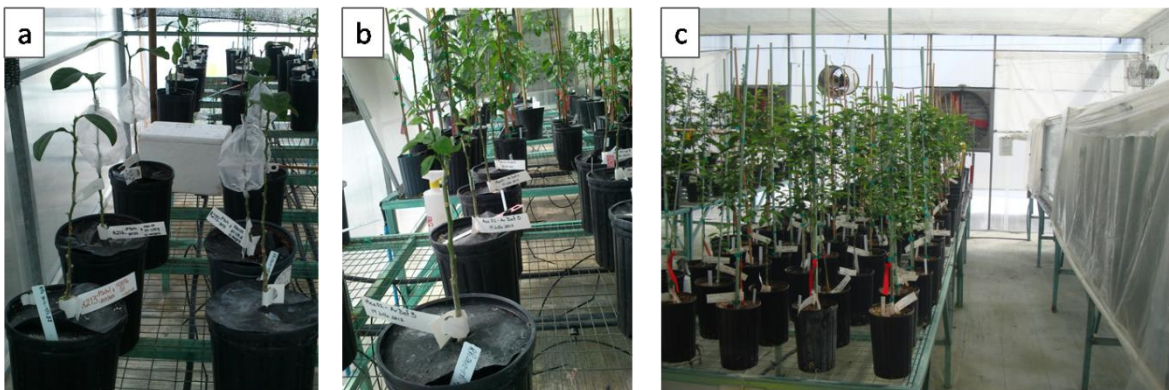


Fig. 23. Plantas regeneradas en invernaderos de bioseguridad.

### **Análisis por PCR para identificar plantas de limón transgénicas**

Se confirmó la presencia del transgén en 13 de los 115 injertos regenerados por propagación vegetativa, mediante la amplificación por PCR del fragmento que codifica para el antimicrobiano  $\beta$ -defensina a los 120 días de desarrollo (Fig. 24).

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

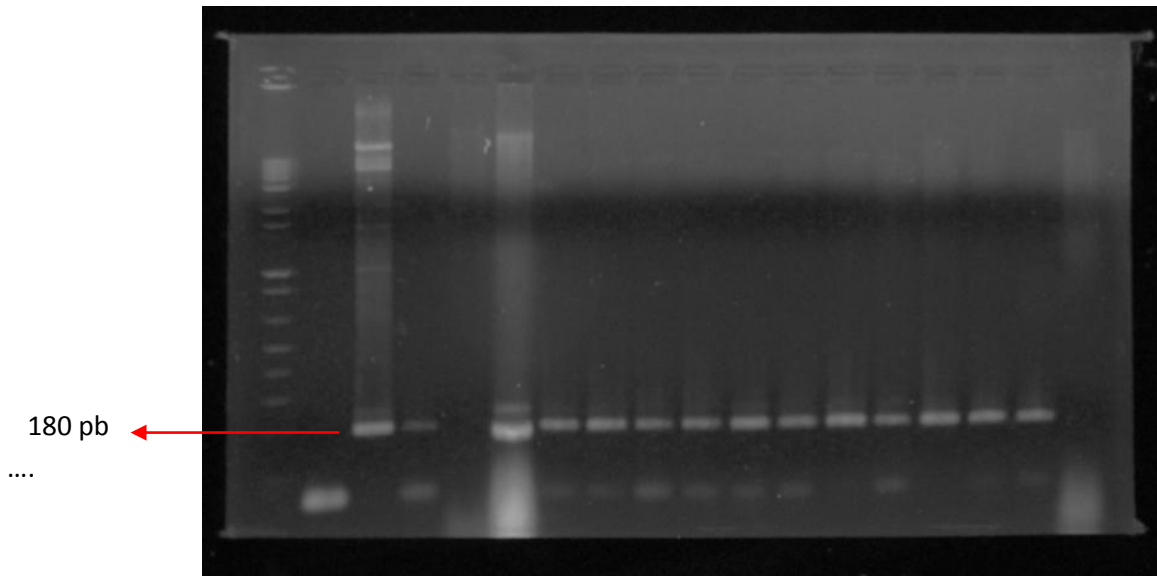


Figura 24. Resultado de la amplificación por PCR al ser visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa Carriles 0. Marcador de peso molecular, 1. Control negativo, 2. Control positivo, 3-17 muestras confirmadas.

En las plantas en las que previamente se confirmó la presencia del transgén se procedió a verificar la expresión de RNA mediante rt-PCR y rt-qPCR (figuras 25 y 26 respectivamente).

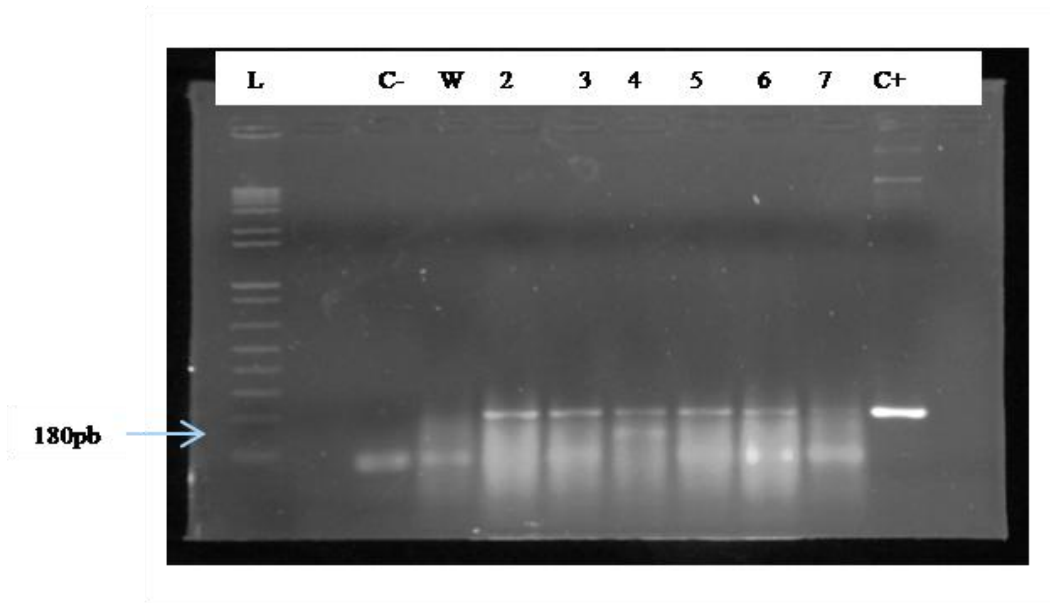


Figura 25. Análisis de expresión de mRNA en plantas GM mediante rt-PCR.  
Carriles: L marcador de peso molecular, C- control negativo, w control silvestre, 2 al 7 muestras, C+ control positivo.

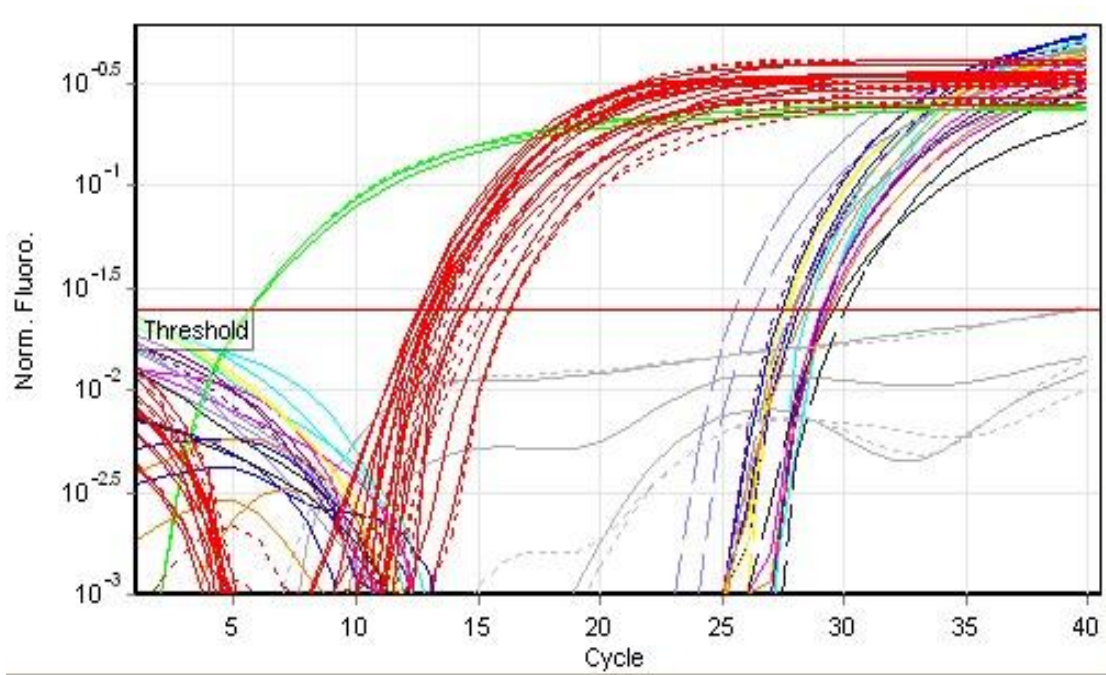


Figura 26. Cuantificación de la expresión mediante rt qPCR analizando por comparación de Ct. En color verde se observa amplificación del control positivo, en color rojo se observa amplificación de gen endógeno COX, en 'ciclo 25' se observa amplificación de muestras positivas para la expresión.

Una vez confirmada la expresión del transgén en los injertos regenerados, se realizaron ensayos de Western Blot para corroborar la presencia de la fusión proteica, indicando que el conjugado de la inmunoglobulina G-fosfatasa alcalina (IgG AP) reconoce al anticuerpo policlonal contra  $\beta$ -defensina, para formar el complejo que es localizado por la reacción colorimétrica de la fosfatasa al agregársele el sustrato BCIP-NBT, observándose en una de las muestras (C8) la banda del tamaño esperado de alrededor de 20 kDa resultado de la fusión CsPP16-DEF (figura 27).



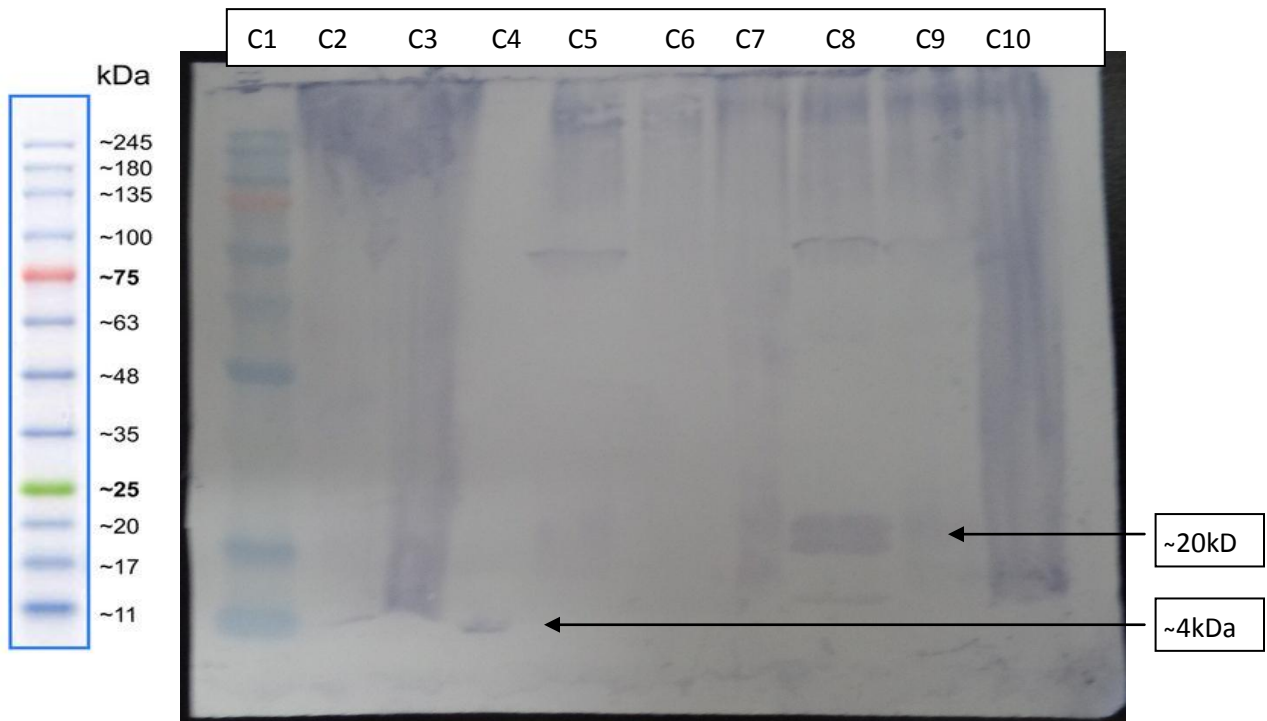


Figura 27. Ensayo de Western blot en el que se observa la expresión de fusión proteica (C9). C1 Marcador, C2 silvestre, C3 silvestre, C4 control positivo (4kD), C5 muestra 1, C6 muestra 2, C7 muestra 3, C8 muestra 4, C9 muestra 5, C10 muestra 6

Se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína en tejido para visualizar su localización (Figura 28), para lo cual se utiliza el mismo principio del ensayo de inmunodetección, observándose de manera interesante, la reacción colorimétrica de la fosfatasa al agregársele el sustrato BCIP-NBT, tanto en células acompañantes como en elementos cribosos del floema.

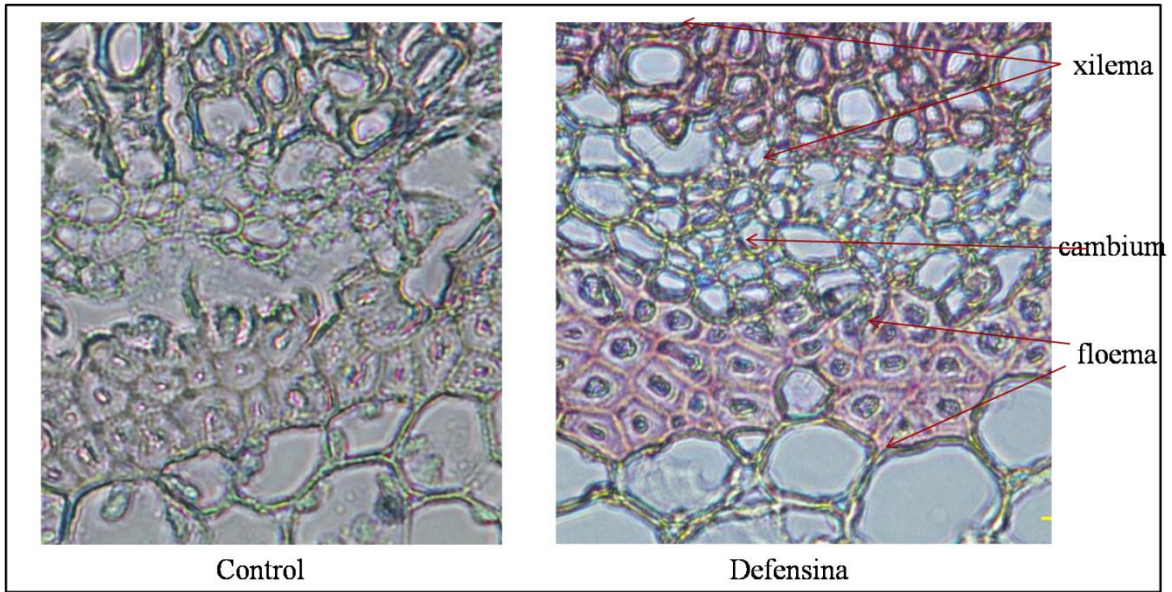


Figura 29. Inmunolocalización en tejido del péptido  $\beta$ -defensina. En el panel de la derecha se observa la reacción colorimétrica, específicamente en el tejido del floema.

## Expresión transitoria

Como se indicó anteriormente, se analizó el efecto de la expresión de  $\beta$ -defensina, en dos experimentos distintos con el fin de verificar si la expresión transitoria del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina, es capaz de eliminar o reducir la presencia de CaLas en plantas enfermas y de inhibir el crecimiento de CaLas en plantas sanas en presencia del vector y la enfermedad.

En ambos casos las plantas tratadas fueron analizadas por la presencia de tejido transformado, encontrando pequeñas zonas tumorales como las que se muestran en la siguiente figura.

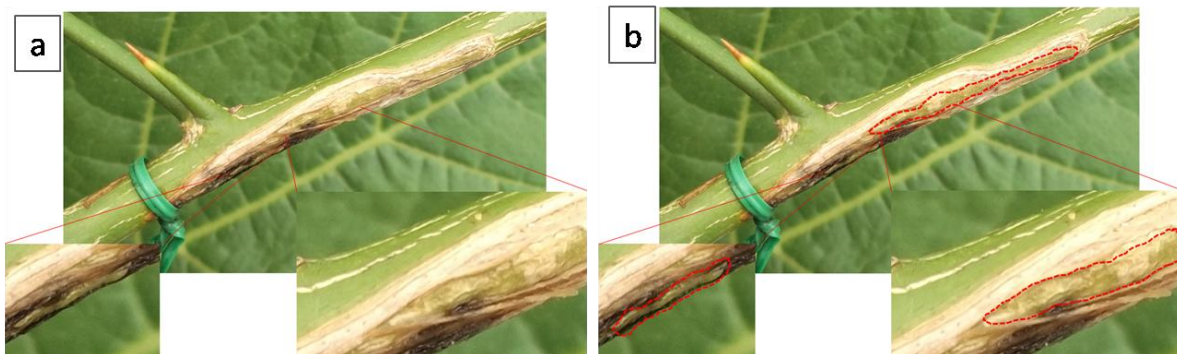


Figura 29. Las plantas inoculadas desarrollan pequeñas áreas fotosintéticas protuberantes a manera de callos. En el panel b se delinearon los tumores con la línea roja para poderse localizar visualmente.

Al ir madurando los tejidos transformados los pequeños tumores fueron más evidentes como se observa en la siguiente figura:



Figura 30. Desarrollo de pequeños tumores hiperproductores de antimicrobianos en los tallos de las plantas

En el experimento 1 además de controles sanos y enfermos se utilizó un control que consistió en emplear al gen reportero GUS indicador del evento de transformación genética. Se obtuvieron los resultados que se observan en los gráficos a continuación:

## Aspecto de plantas después de 100 días de tratamiento

**Antibiótico  
defensina**



**Control**



Figura 31. Ejemplo del aspecto de las plantas expresando las proteínas antibacterianas. Imagen superior, brote sano producido que no contiene síntomas en la planta expresando defensina. Imagen inferior, planta control expresando síntomas de amarillamiento, característico de HLB.

## **Estimación del contenido de *Candidatus Liberibacter* en las plantas**

Se obtuvieron muestras de plantas consistentes en hojas preexistentes y hojas nuevas. Las plantas se procesaron de acuerdo a los procedimientos de detección establecidos por Senasica en el laboratorio de la Dra. Ruth Sandoval Luna en CESVY, Mérida.

En resumen, se disectó la vena central de la hoja y se corto en pequeñas piezas con la ayuda de una navaja desechable. El tejido fue pesado (100 mg) y procesado de dos formas: 1. Obtención de DNA total empleando un kit comercial de purificación. 2. Tratamiento con Etidio Mono Azida (EMA) y posterior purificación de DNA. Este tratamiento permite discriminar si el DNA usado como templado estuvo en bacterias vivas o muertas.

Abajo se muestran los resultados obtenidos de este análisis. Como se puede observar, la cantidad de bacteria viva disminuyó en los tratamientos, aunque no se eliminó completamente. Se debe señalar que este ensayo de expresión transitoria expresa en regiones discretas de la planta al antimicrobiano empleado y que no se puede controlar la cantidad producida. Se observa en la gráfica el tamaño total de la barra como indicativo de la detección total de la bacteria y con color azul la cantidad de bacterias muertas, mientras que con rojo se observa la cantidad de bacterias vivas. De manera general, los tratamientos tienen hasta un sexto de la carga presente en las plantas enfermas control. Este resultado es muy promisorio si consideramos que estas plantas son quimeras productoras de antimicrobianos.

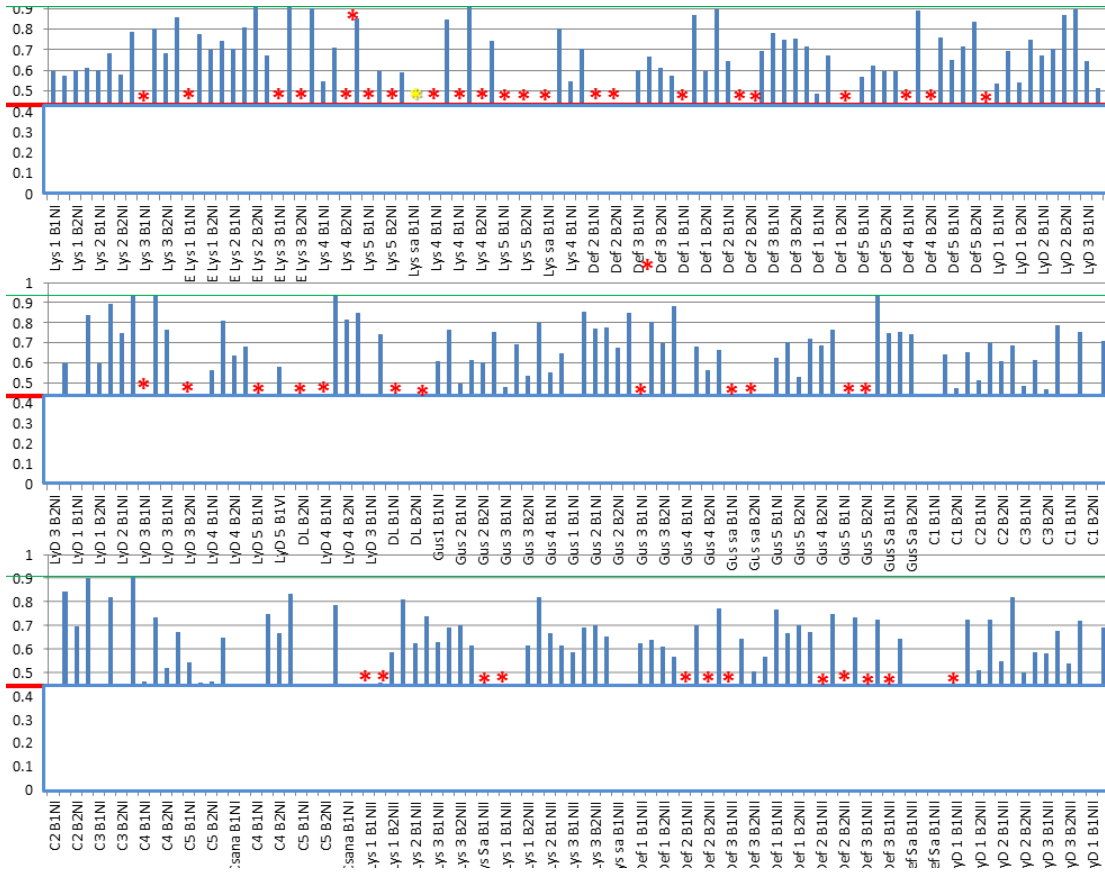


Figura 32. Cuantificación por PCR en tiempo real de la bacteria CLa en plantas tratadas con antimicrobianos a los 120 días de tratamiento. Cada barra indica un valor de detección de la bacteria normalizado con el gen endógeno COX. Los asteriscos rojos indican las muestras que ya no puede detectarse la bacteria. El asterisco amarillo muestra una planta sana.

La detección a 120 días demuestra una disminución general de la carga bacteriana, aunque en algunas muestras, los valores obtenidos son similares a los controles sanos, como se observa en la siguiente figura:

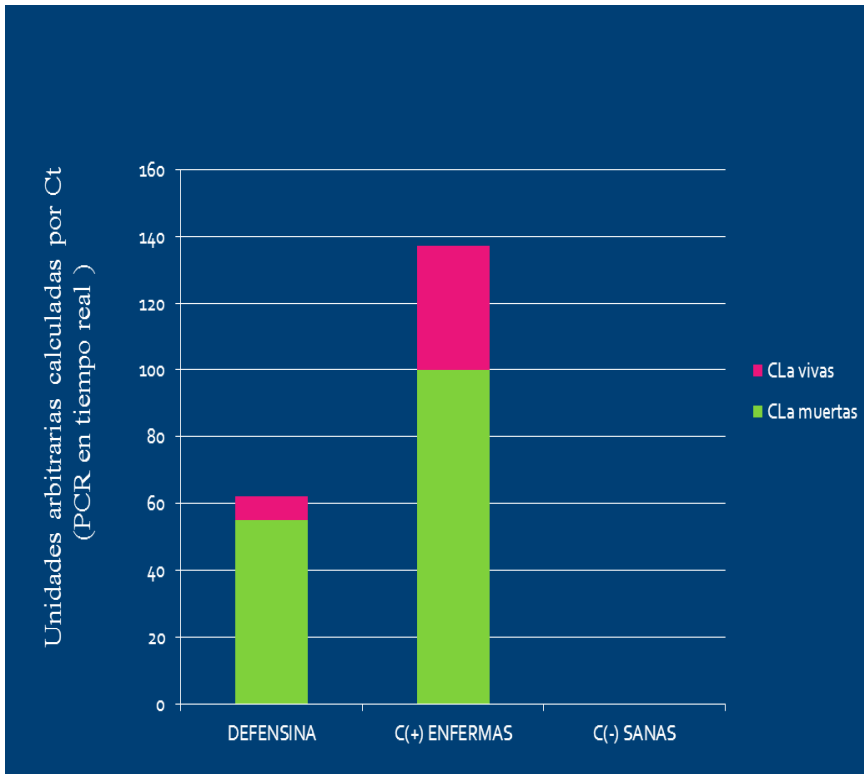


Figura 33. Comparación de la carga bacteriana entre plantas inoculadas con la construcción  $\beta$ -defensina, plantas sin tratamiento y plantas sanas.

### Medición de fotosíntesis de las plantas tratadas

Se tomaron diez mediciones en cada planta, las cuales se registraron y promediaron en programa Excel, las unidades son  $\mu\text{moles CO}_2/\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$ , como se muestra en la siguiente gráfica de los valores obtenidos.



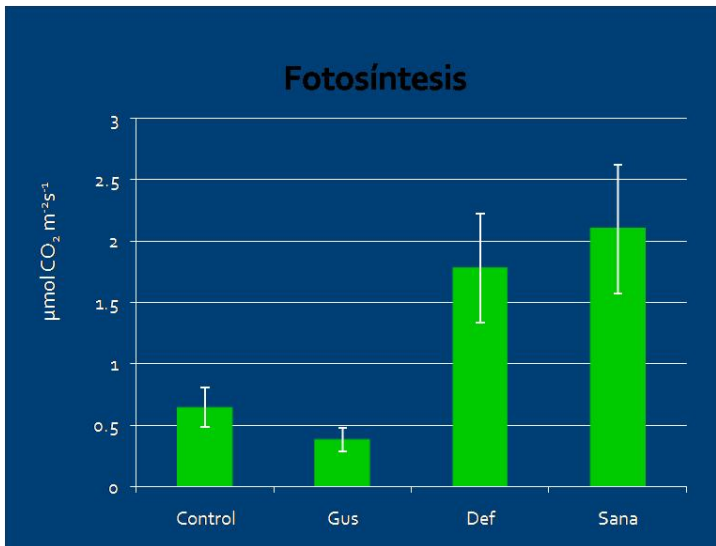


Figura 34. Promedio de fotosíntesis registrado en hojas a los 90 días del experimento de expresión transitoria. El grupo de plantas enfermas control posee un valor de fijación de CO<sub>2</sub> inferior al de los tratamientos.

Las plantas enfermas, así como las plantas inoculadas con *Agrobacterium* conteniendo la construcción GUS, mostraron una tasa fotosintética baja, observándose diferencias significativas respecto a las plantas tratadas con *Agrobacterium* conteniendo la construcción β-defensina, la cual presentó una tasa fotosintética similar a la registrada en plantas sanas.

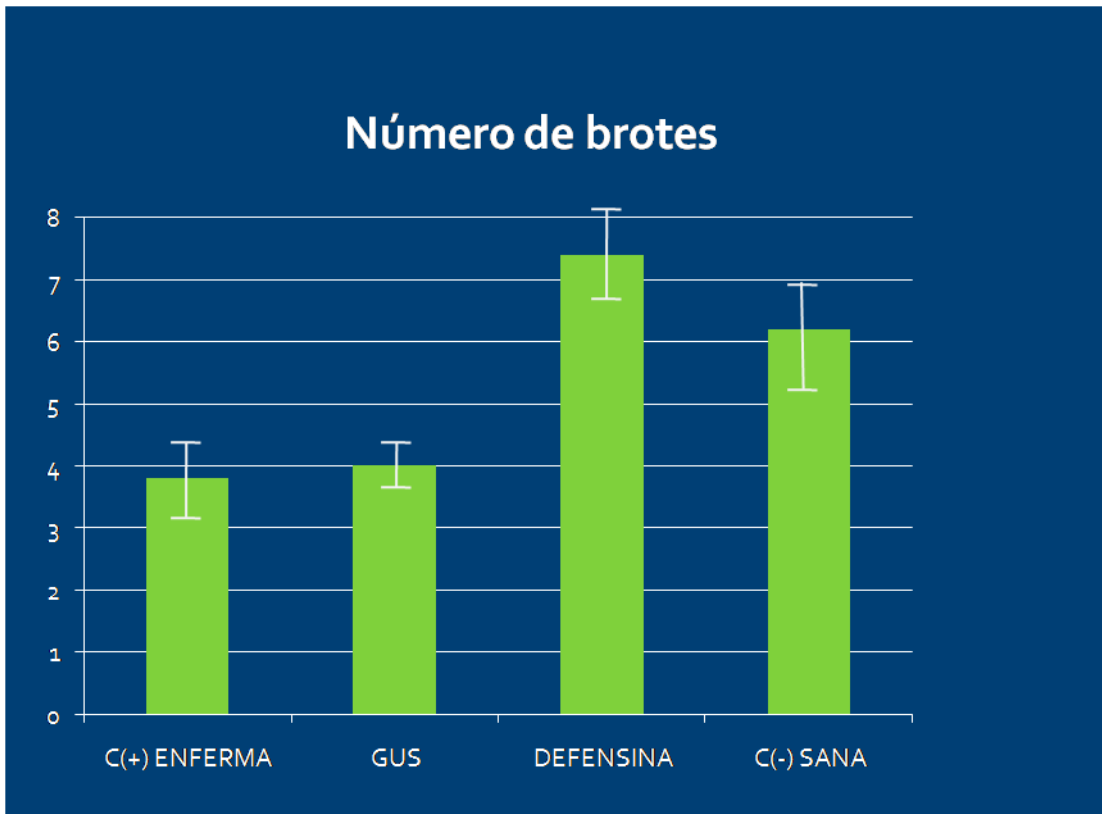


Figura 35. Promedio de número de brotes nuevos presentes en los diferentes tratamientos a los 90 días de realizar el ensayo de expresión transitoria.

El número de brotes nuevos, así como la longitud de los mismos se vio disminuido en plantas enfermas y plantas inoculadas con *Agrobacterium* conteniendo la construcción GUS. Por otro lado, las plantas inoculadas con *Agrobacterium* conteniendo la construcción  $\beta$ -defensina, muestran un número de brotes y la longitud de los mismos, similar a los de las plantas sanas, sin observarse diferencias significativas entre ellos, como se observa en los gráficos 36 y 37.

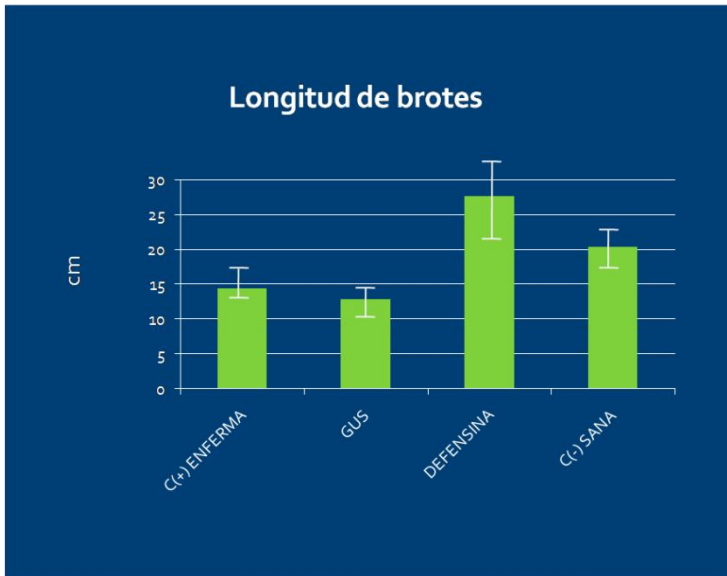


Figura 36. Promedio de la longitud de los brotes nuevos en los distintos tratamientos tomado a los 90 días del experimento de expresión transitoria siendo las plantas con brotes más grandes aquellas que recibieron los tratamientos con antimicrobianos.

Cabe señalar que en este periodo, las plantas no fueron fertilizadas, con el objeto de evidenciar los síntomas de HLB, los cuales son más marcados cuando las plantas tienen estrés nutricional.

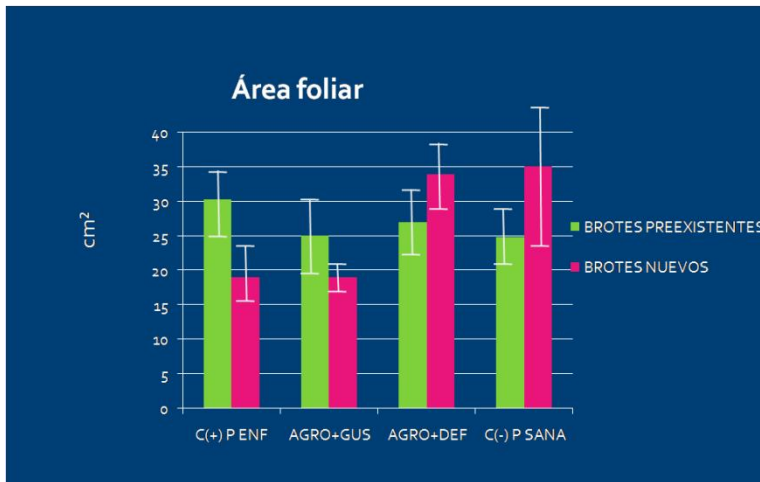


Figura 37. Promedio de área foliar en brotes nuevos y preexistentes de los distintos tratamientos.

Con respecto al área foliar se observa un incremento en el área de las hojas de brotes nuevos similar al observado en plantas sanas y con diferencias significativas al compararlo con plantas enfermas y plantas tratadas con *Agrobacterium* sin la construcción.

Con respecto al experimento 2 las plantas tratadas con la construcción CsPP16-DEF no mostraron desarrollo de síntomas después de un año de estudio, en la mayoría de los casos no se detectó la presencia de CaLas mediante PCR en tiempo real, en éste caso, las plantas fueron sembradas directamente en el suelo, por lo que el crecimiento en longitud y número de brotes fue rápido, comparado con el experimento en invernadero.

### **Expresión transitoria utilizando la fusión Cspp16-DEF-GFP**

En el experimento de expresión transitoria utilizando el marcador GFP se pudo observar la acumulación en floema de la construcción proteica, a partir de las dos semanas después del tratamiento (Figura 39). Éstos resultados de acumulación en floema son similares a lo observado en el experimento de transformación genética y detección inmunoquímica de la proteína, indicando que la construcción CsPP16-DEF se estaría acumulando en células acompañantes y elementos cribosos.

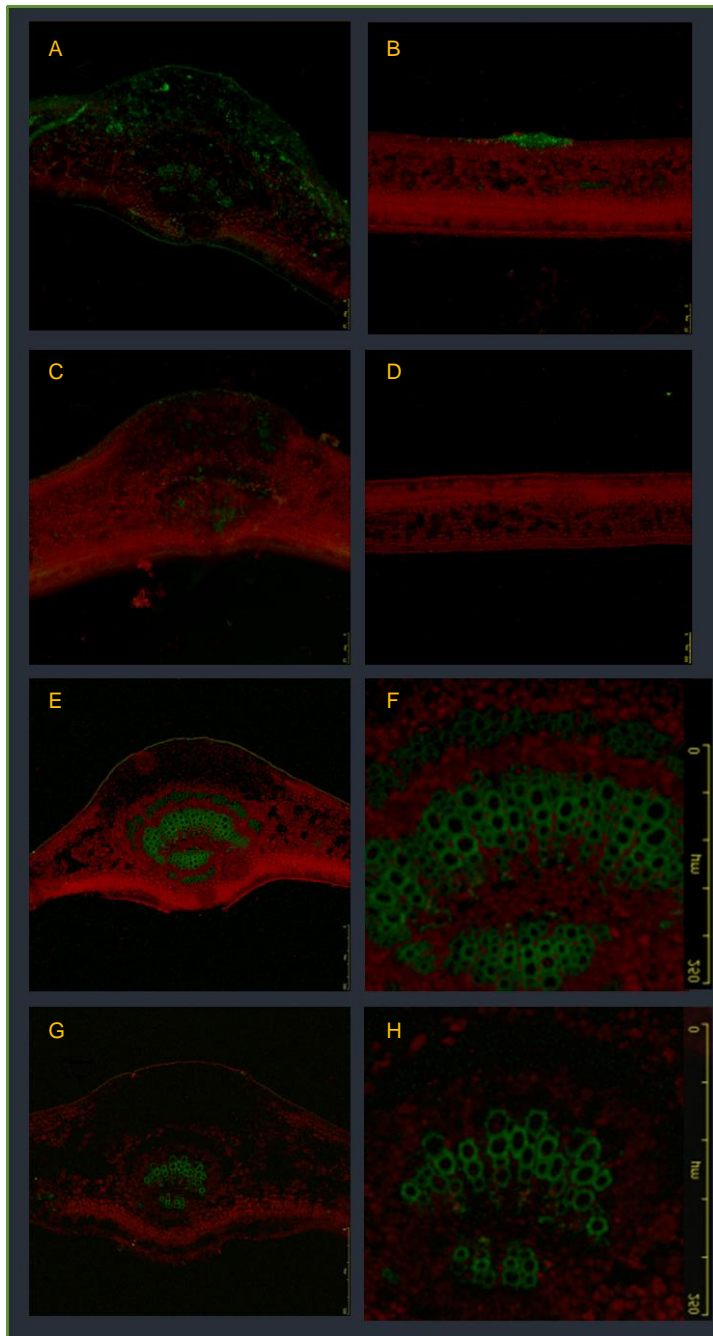


Figura 38. El patrón de localización confocal antimicrobiano-GFP indica la acumulación específica en floema de la fusión proteica. A) y C) Secciones transversales de hojas jóvenes y maduras que muestran respectivamente la expresión con un patrón natural de acumulación en floema del péptido antimicrobiano fusionado al gen marcador GFP. E) Sección transversal de la hoja madura agroinfiltrada con la fusión de proteínas que muestra la señal en la epidermis. G) Ampliación de las secciones transversales que muestran la acumulación específica de floema de la fusión proteica. B), D), F) y H) Secciones transversales de los controles WT para sus contrapartes (A, C, E y G).

Se verificó la presencia de la construcción genética CsPP16-DEF-GFP en las cepas utilizadas para la expresión transitoria

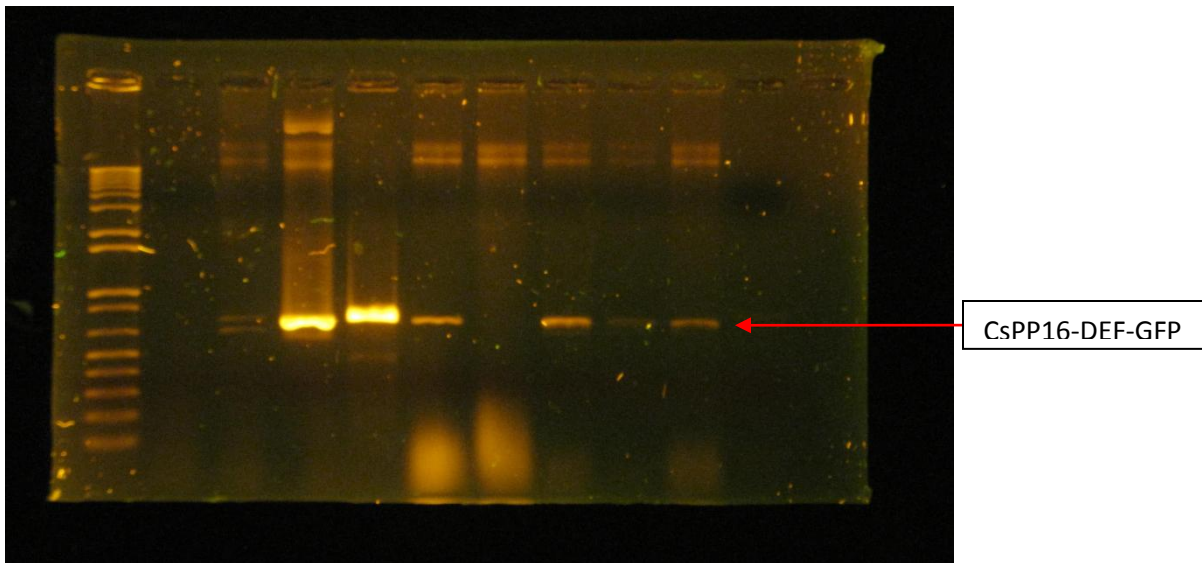


Figura 39. Detección por PCR para GFP. Carril 1. Marcador de peso molecular. 3-10 identificación del transgén GFP en DNA extraído de *Agrobacterium* utilizado para la expresión transitoria.

## DISCUSION

Considerada una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos a nivel mundial, Huanglongbing es además una enfermedad muy compleja por la interacción de varios factores que dificultan su manejo.

El rango de especies de plantas infectadas naturalmente por una cierta especie de *Ca. Liberibacter* está restringido por el rango de hospedador del psílido vector, que normalmente está limitado a unas pocas especies de plantas estrechamente relacionadas. Sin embargo, parece que tanto los psílicos como las bacterias tienen una gran capacidad de evolución y están listos para saltar sobre nuevas especies de plantas, siguiendo los cambios en la vegetación y los factores ambientales. Las plantas silvestres nativas pueden haber desarrollado resistencia o tolerancia a los psílicos locales y a los patógenos bacterianos, y aunque albergan bajos niveles de bacterias, estas plantas no desarrollan síntomas graves de la enfermedad (Haapalanien, 2014).

Los liberibacters causan síntomas de la enfermedad al provocar respuestas vegetales autodestructivas y / o que afectan la función del floema, lo que a su vez contribuye al desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Los liberibacters causan disfunciones en la carga, descarga y transporte del floema, lo que finalmente conduce al desarrollo de síntomas de la enfermedad. La presencia física de *Liberibacter* y sus actividades metabólicas puede alterar la función del floema, al alterar los gradientes osmóticos o la integridad de la conductividad del floema. Además, el reconocimiento de plantas de PAMP (del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*) (por ejemplo, flagelos y LPS) de *Liberibacter* podría provocar respuestas de plantas autodestructivas, incluida la acumulación de proteínas del floema y callosa en el floema cítrico en respuesta a la infección. Las (Wang *et al.*, 2017).

En las distintas áreas productoras de cítricos en todo el mundo, se necesitan diferentes estrategias, dependiendo del nivel de amenaza de *CaLas* y ACP y la



etapa de HLB. Adoptando medidas de cuarentena para mantener libre de HLB (por ejemplo Australia y las zonas mediterráneas productoras de cítricos, California). Sin embargo, el que esas áreas recién infectadas pueden evitar que el HLB se vuelva endémico no solo depende de la implementación estricta de medidas de cuarentena y erradicación, sino que también depende del esfuerzo de control en las zonas vecinas productoras de cítricos de la zona epidemiológica. Para las áreas recién infectadas, el diagnóstico temprano y preciso de HLB y la detección de CaLas son fundamentales para la eliminación del inóculo. Para las regiones endémicas de HLB, tanto el control de psílidos por métodos químicos como biológicos son componentes críticos del manejo de HLB (Wang *et al.*, 2017).

Las aplicaciones foliares de micronutrientes se han usado ampliamente en Florida con el fin de mitigar las deficiencias minerales inducidas por HLB y para contrarrestar los efectos debilitantes de la enfermedad. El programa de nutrientes a menudo incluye micronutrientes combinados con SA y / o fosfito. Sin embargo la efectividad de estos tratamientos ha sido controvertida (Xia *et al.*, 2012, Gottwald *et al.*, 2012, Shen *et al.*, 2013, Stansly *et al.*, 2014). En general, estos estudios sugieren que los nutrientes foliares promueven el crecimiento arbóreo, en árboles asintomáticos o plantados en huertos de cítricos con nutrientes del suelo pobres en una etapa temprana de la infección y que los inductores de defensa pueden conferir un nivel moderado de control de la enfermedad pero no pueden disminuirla en árboles infectados. Sin embargo, el programa de nutrientes parece no tener un efecto significativo en árboles con HLB positivo en etapas avanzadas de la infección (Wang *et al.*, 2017).

Los tratamientos de termoterapia se han usado durante décadas para prevenir o eliminar enfermedades en las plantas, (Kunkel, 1936). En el caso de los cítricos, se ha reportado, una disminución en los síntomas de HLB después del tratamiento térmico (Hoffman *et al.*, 2013; Ehsani *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2013). El desafío actual con la termoterapia es que, aunque se pueden alcanzar temperaturas suficientemente altas en las partes aéreas de la planta, es improbable que se alcancen temperaturas de muerte en las raíces donde el suelo amortigua el

tratamiento térmico. Por lo tanto, es muy probable las raíces sirvan como reservorios para la reinfección del dosel. (Ehsani *et al.*, 2013). Lo anterior, aunado a que el árbol continúa siendo susceptible a la transmisión por el insecto vector.

Se ha demostrado que los bactericidas, incluidas la ampicilina, la carbenicilina, la cefalexina, la oxitetraciclina, la penicilina, la rifampicina, el sulfato de estreptomicina y la sulfadimetoxina, son muy eficaces para eliminar o suprimir Las en los árboles infectados (Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, como se menciona al inicio, en general, el uso de antibióticos en plantas y animales de consumo humano no es aprobado por los organismos de salud. El sulfato de estreptomicina, el clorhidrato y el complejo de calcio han sido aprobados para su uso en el control del HLB mediante rociado foliar en Florida desde 2016. Los beneficios y la eficacia de estos bactericidas en la industria cítrica de Florida a través del rociamiento foliar aún no se han determinado. Por otro lado, queda por determinar si Las puede desarrollar resistencia contra los bactericidas. La aparición de la resistencia a los bactericidas generalmente es el resultado de la transferencia horizontal de genes de los elementos genéticos móviles que llevan los genes de resistencia entre las bacterias que conviven en un mismo ambiente (von Wintersdorff *et al.*, 2016) y en menor medida por la mutación de los objetivos bacterianos. La transferencia horizontal de genes está muy extendida entre las bacterias. Se postula, por ejemplo, que los genes de resistencia a tetraciclina (que codifican proteínas de eflujo o protección ribosómica) en muchas bacterias han sido adquiridos por transferencia horizontal de genes a partir de los estreptomicetos productores de tetraciclina (Chopra y Roberts, 2001). Aún cuando se postula que es menos común en las bacterias intracelulares (incluidos los Liberibacter) porque están aisladas de poblaciones microbianas externas (Tyler *et al.*, 2009; McCutcheon *et al.*, 2011). Se han descubierto en el intestino ACP, varios simbiontes bacterianos, incluyendo *Wolbachia spp.*, *Carsonella DC* y "*Candidatus Proffella armatura*" (Nakabachi *et al.*, 2013), los cuales pudieran servir potencialmente como donantes de genes de resistencia. Se ha sugerido que CaLas haya adquirido lysE de "*Ca. Proffella armatura*" a través de transferencia horizontal de genes (Nakabachi *et al.*, 2013). Sería necesario determinar si alguno

de los microorganismos intestinales contiene genes de resistencia a bactericidas. Cabe resaltar que, *CaLas* contiene los transportadores ABC Msb1 y MsbA2, que comparten una alta identidad con *E. coli* MsbA y se ha predicho que confieren resistencia a múltiples fármacos a *CaLas* (Schultz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Queda por determinar si los genes similares a MsbA pueden contribuir al desarrollo de resistencia a bactericidas y si el uso a largo plazo de bactericidas conducirá a la resistencia antimicrobiana de *Las* (Wang *et al.*, 2017).

El desarrollo de nuevos cultivares a través de la hibridación convencional es muy difícil debido al alto nivel de embriones nucleares en estos cultivares. Muchos cultivares de cítricos han surgido a través del desarrollo de mutaciones y han sido seleccionados posteriormente durante cientos de años (Fang y Roose, 1997). En tales casos, la mejora genética de los cultivares existentes sin cambiar sus características a través de la incorporación de un rasgo ventajoso adicional sigue siendo el método más rápido de mejora. La ingeniería genética de éstas variedades es una alternativa viable a la reproducción convencional, ya que es un proceso relativamente rápido y permite la inserción de un único rasgo sin modificar los rasgos existentes (Manjul *et al.*, 2015).

No se han encontrado variedades resistentes, por lo tanto, el mejoramiento genético a través de la introducción de genes que generen resistencia se ha propuesto como la alternativa más viable debido a la rapidez con que se ha expandido alrededor del mundo y las pérdidas económicas que ha generado.

Recientemente se han publicado tres trabajos que han encontrado “resistencia mejorada” al HLB (Manjul *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2017). El primero de ellos basado en NPR1, el cual es un factor central en la resistencia adquirida sistémica de la planta (Cao, 1997), y se ha utilizado ampliamente para mejorar la resistencia de las plantas a patógenos, tales como trigo, fresa, algodón, zanahoria, arroz, etc. (Song *et al.*, 2017). Manjul *et al.*, (2015), indican que la sobreexpresión de cítricos transgénicos NPR1 mostró una mayor resistencia a HLB en el ensayo de campo. En el segundo estudio, publicado por Hao y col. (2016) se analizó una teonina modificada. Las tioninas son proteínas de bajo peso

molecular únicamente presentes en plantas superiores, y son tóxicas para bacterias y hongos in vitro (Florack y Stiekema, 1994), pertenecen a la familia PR13 y se consideran péptidos antimicrobianos de plantas (Tam, 2015). Los autores indican que los cítricos transgénicos mostraron una mayor resistencia a HLB (Hao et al., 2016). Finalmente Zou *et al.*, (2017) utilizaron cecropina B, un péptido antimicrobiano, del gusano de seda del roble chino (*A. pernyi*) expresado bajo un promotor específico del floema para reducir la susceptibilidad al HLB. Estudios realizados anteriormente en distintas plantas han producido resultados variables y contradictorios con respecto a la resistencia a enfermedades. Por lo tanto, los autores mencionan que no hay garantía de que un péptido que sea eficaz en un huésped contra un patógeno sea efectivo en un huésped diferente contra un patógeno diferente (Zou *et al.*, 2017).

Una de las dificultades que ha generado este enfoque, y que se aborda en el presente trabajo, es el hecho de que la bacteria causante de la enfermedad se desarrolla en el floema, específicamente en los elementos cribosos (formado por células que carecen de núcleo), sitio en el cual es inoculada por el insecto vector al alimentarse. Diversos autores han expresado péptidos antimicrobianos en cítricos buscando generar resistencia a la enfermedad, sin embargo, los elementos del tamiz maduro no producen proteínas porque no tienen núcleo. La mayoría de las proteínas del floema se producen en células acompañantes y luego se transfieren a elementos cribosos maduros (Sjolund, 1997). Por lo tanto, en trabajos que busquen expresar péptidos antimicrobianos, sería necesario usar un mecanismo de dirección similar (el péptido señal de algunas proteínas del floema) para administrar proteínas antibacterianas o ARNm en los elementos cribosos (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999) para aumentar las posibilidades de interacción entre los péptidos y las células bacterianas que matarían eficientemente al patógeno (Zou *et al.*, 2017). Ya que, como se explica anteriormente, existen mecanismos de reconocimiento presentes en los plasmodesmos, que impiden o permiten el paso de moléculas a través de ellos.

En concordancia con lo anterior, en el presente estudio, se demuestra mediante transformación genética, así como análisis de DNA, RNA e inmunolocalización, que es posible expresar péptidos en células acompañantes y dirigirlos hacia los elementos cribosos en cítricos, al fusionarlos a la proteína homóloga de CmPP16. Dicha proteína, mantendría la capacidad de moverse naturalmente a través de los plasmodesmos y ubicarse en los elementos cribosos, que es el sitio donde se desarrolla la bacteria causante de HLB, permitiendo así la interacción con el péptido antimicrobiano. Lo anterior podría ser aplicado en numerosas enfermedades de plantas en las que el patógeno se aloja en elementos cribosos.

La transformación genética se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Cervera *et al.* (2005), debido a que mediante ésta técnica se obtiene un menor de regeneración al utilizar plántulas como tejido fuente. Se realizaron varias pruebas con el fin de reducir los tiempos de germinación y desarrollo de las plántulas, obteniendo las mejores condiciones al retirar la testa de las semillas después de la desinfección inicial, seguido de las condiciones de luz y oscuridad descritas en la metodología.

Los ensayos de injertación directa de los explantes transformados, sobre patrones de aproximadamente 6 meses de desarrollo disminuyeron los tiempos de regeneración en aproximadamente 3 meses comparado con los ensayos en que se injertó el meristemo apical, sobre un portainjerto de aproximadamente 1 mes de germinación obtenido *in vitro*, y posteriormente transferido a una planta patrón en invernadero. Haría falta confirmar si el tejido completo (aprox. 7 mm) de los explantes transformados es uniforme en cuanto a la inserción del transgén, o que por el contrario fueran diversos eventos de transformación que dan lugar a un mismo brote, el cual, pudiera resultar en quimeras, trayendo consigo problemas de detección de DNA en plantas desarrolladas dependiendo del sitio donde se tome la muestra, lo cual es difícil que suceda con el uso de meristemos apicales, al reducir el número de células injertadas.

Por otro lado, mediante los Experimentos de Expresión Transitoria, se demuestra que es posible realizar expresión transitoria de antimicrobianos en plantas

perennes, disminuyendo considerablemente los periodos de tiempo que suponen los estudios de transformación genética, que pretenden probar, como objetivo parcial o final, la efectividad de péptidos antimicrobianos, que son difíciles de probar *in vitro* debido a que la bacteria no puede ser cultivada.

Mediante “expresión en mosaico” se demuestra que la fusión del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina a la proteína homóloga en cítricos de CmPP16 confiere tolerancia a la enfermedad Huanglongbing al realizar expresión en mosaico. Nuestros resultados muestran una clara disminución gradual en el contenido de CaLas, en plantas tratadas respecto a los controles enfermos a los 30 y 180 días, tal disminución no se mantiene a los 360 días, lo que podría estar relacionado con distintos factores, entre ellos: la continua regeneración del tejido floemático debido al uso de plantas jóvenes para el estudio, el incremento en la talla de los árboles, que disminuiría considerablemente la concentración del antimicrobiano expresado, e incrementado por las fluctuaciones naturales debido a diversos factores.

Aunado a lo anterior las plantas expresando defensina mostraron un incremento en el número de brotes nuevos y en la longitud de los mismos, observándose diferencias significativas con respecto a los controles, algunos autores sugieren que péptidos similares a defensinas están involucrados en procesos de señalización, durante el desarrollo de la planta y la floración (Stotz *et al.*, 2009; Higashiyama, 2010). Lo cual apoyaría éstos resultados y podría ser abordado en investigaciones futuras. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas con respecto a las hojas maduras que mostraban síntomas, antes y durante el tratamiento, lo anterior pudiera ser debido a que (como se explicó anteriormente), en las áreas afectadas (con síntomas de HLB), el flujo a través del floema se encuentra interrumpido, razón por la cual los antimicrobianos no estarían alcanzando los objetivos bacterianos, con la misma rapidez que en los brotes con libre flujo.

Con respecto a la fotosíntesis en plantas inoculadas con *Agrobacterium* conteniendo la construcción CMPP16-DEF, ésta aumentó considerablemente con

respecto al inicio del tratamiento, así como, respecto a los controles, que se ve reflejado en una mejora general en el aspecto de las plantas y que se relaciona directamente con la disminución considerable de la carga bacteriana. Como se explicó al inicio la obstrucción de las placas cribosas es una respuesta de defensa de la planta ante la presencia de *Candidatus Liberibacter*, ante dicha obstrucción la fotosíntesis se detiene por acumulación de almidón en las hojas debido a que éste no puede ser transportado a los sumideros, por lo que también se detiene el crecimiento. La obstrucción de las placas cribosas es un evento que la planta puede revertir de manera natural y que en éste caso estaría realizando ante la considerable disminución de la carga bacteriana, permitiendo así el libre flujo de fotoasimilados lo que permite a la planta retomar sus funciones de crecimiento y generación de brotes nuevos, aunque el proceso de liberación sería lento ya que los antimicrobianos deberían viajar precisamente por los elementos cribosos que se encuentran obstruidos, al tratarse de expresión en mosaico.

Mediante análisis por microscopía confocal de la construcción CsPP16-DEF-GFP en Experimentos de Expresión Transitoria se puede observar que la construcción se acumula en tejido floemático (Fig. 41), corroborado que dicha construcción se estaría acumulando en los sitios en los cuales se desarrolla la bacteria causante de HLB.

En las plantas con transformación genética se observó un crecimiento normal, indicando que el evento de transformación no afectó negativamente la fisiología general de la planta, debido al espacio limitado de los invernaderos de bioseguridad, no se logró llevar a cabo estudios, sobre una posible implicación de la  $\beta$ -defensina en eventos de desarrollo, como pueden ser, incremento en el número y longitud de los brotes, incremento del área foliar, como lo sugieren los estudios de expresión transitoria.

La producción exitosa de nuevas variedades de plantas con mayor resistencia a los patógenos mediante la expresión de genes antibacterianos transgénicos depende de la naturaleza de la planta receptora, el patógeno específico y el gen fuente. Durante las primeras etapas de las respuestas de las plantas a la infección

por patógenos, los AMP, junto con los metabolitos antimicrobianos y las proteínas relacionadas con el estrés, actúan como componentes de un mecanismo de defensa basal no específico (Bent y Mackey 2007; Holásková *et al.* 2015; Zou *et al.*, 2017). En el caso del HLB y otras enfermedades habría que agregar, que la ubicación del patógeno, dificulta el éxito.

En resumen, HLB es una enfermedad devastadora por los numerosos factores enumerados a lo largo del presente trabajo. Estando entre ellos la velocidad de la propagación y tratándose de una enfermedad silenciosa, varias regiones alrededor del mundo se han visto rebasadas por la enfermedad, reflejándose en afectaciones a su economía. Se han logrado avances en varios aspectos relacionados con la enfermedad (principalmente manejo preventivo y correctivo). Así como en los estudios de mejoramiento genético publicados recientemente incluyendo el presente estudio. Sin embargo, ante los resultados obtenidos hasta el momento, se está proponiendo que, no solo se necesita resistencia mejorada o tolerancia, sino que se deben producir cítricos con resistencia multigénica (una combinación de genes múltiples que imparten diferentes mecanismos de resistencia) para asegurar que los nuevos árboles resistentes no sean superados por un nuevo mutante CLas. Es decir, la falla en la resistencia puede no verse antes, pero más tarde, puede romperse, antes de que los árboles recién desarrollados alcancen rentabilidad o poco después, lo que hace que los árboles transitorios resistentes tengan un valor limitado (Gottwald y McCollum 2017).

Ya sea que estemos investigando las modificaciones genéticas a los cítricos o las tecnologías antes mencionadas, los enfoques de investigación estándar han sido lentos para producir soluciones notables (Gottwald y McCollum 2017).

Por otro lado, numerosos enfoques de investigación para el control / mitigación HLB están en marcha simultáneamente, tales como prácticas culturales (es decir, acidificación del suelo y otros remedios hortícolas), antimicrobianos / antibióticos, compuestos nano-zinc para reducir o eliminar poblaciones CLas, tecnologías RNAi para reducir la supervivencia de ACP y / o CLas en el vector y / o cítricos, terapia térmica y biocontrol, por nombrar algunos (Gottwald y McCollum 2017).



## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demuestra que es posible realizar la expresión del antimicrobiano Defensina en floema al unir dicho péptido a la proteína Cspp16.

La transformación genética es un proceso que requiere alrededor de 6 meses, desde la germinación de la semilla hasta la injertación, con una eficiencia de transformación entre 1 y 2% lo cual lo convierte en un proceso costoso, ya que se requiere de plantas patrón, certificadas y el espacio en invernaderos de bioseguridad.

El método de expresión transitoria o expresión en mosaico es capaz de expresar un transgén en plantas maduras de limón, lo cual puede ser una herramienta que permite disminuir considerablemente los tiempos para realizar algunas pruebas de mejoramiento genético.

La expresión transitoria del antimicrobiano defensina, disminuye la presencia de la bacteria causante de HLB, así como los síntomas de la enfermedad en plantas de limón a los 60 y 120 días.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrecht, U., Bowman, K. D. (2008). Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Sci* 175: 291–306

Ammar, E. D., Shatters, R. G., Hall, D. G. (2011). Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. *J Phytopathol* 159:726–734

Antimicrobial Peptide Database APD (2018) <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

Aritua, V., Achor, D., Gmitter, F. G., Albrigo, G., Wang, N. (2013). Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *PLoS ONE* 8: doi

Bagio, T., Canteri, M., Barreto, T. y Leite, R. (2016). Activation of systemic acquired resistance in citrus to control huanglongbing disease. *SEMINA: CIENCIAS AGRARIAS*. 37. 1757-1766. 10.5433/1679-0359.2016v37n4p1757.

Belasque, J., Yamamoto, P., Miranda, M., Bassanezi, R., Juliano A., Bové, J. (2010). Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. *Citrus Research & Technology*. 31. 53-64. 10.5935/2236-3122.20100005.

Bendix, C. y Lewis, J. D. (2016). The enemy within: phloem-limited pathogens: Phloem-limited pathogens. *Molecular Plant Pathology*. 19. 10.1111/mpp.12526.

Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Path.* 88(1): 7-37.

Bové, J. M. (2014). Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica* 42: 579.

Bové, J.M. y Garnier, M. (2002). Phloem- and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Sci*. 163, 1083–1098.

Burckhardt, D., Ouvrard, D. (2012). A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa* 3509: 1-34.

Cao, H. (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-63.

Castañeda-Casimiro, J., Ortega-Roque, J. A., Marcela, A., Aquino-Andrade, A., Serafín-López, J., Estrada-Parra, S., y Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Artemisa*, 18, 16–29.

Cervera, M., J. Juárez, L. Navarro and L. Peña. 2005. Genetic transformation of mature citrus plants. In *Transgenic Plants. Methods and Protocols*. Ed. L. Peña. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 177–188.

Cho H., Dang T. V. T., Hwang I. (2017). Emergence of plant vascular system: roles of hormonal and non-hormonal regulatory networks *Curr Opin Plant Biol*, 35 pp. 91-97

Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232–60

Cobo, E., Chadee, K. (2013). Antimicrobial human  $\beta$ -defensins in the colon and their role in infectious and non-infectious diseases. *Pathogens* 2:177–92.

Cytryńska, M. y Zdybicka-Barabas, A. (2015). Defense peptides: Recent developments. *Biomolecular Concepts*, vol. 6, no. 4, pp. 237–251.

da Graça, J., Douhan, G., Halbert, S., Keremane, M., Lee, R., Vidalakis, G., Zhao, H. (2016). Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *IJPB* 58:373-387.

DeFranco A L, Locksley RM, Robertson M. *Immunity* (2007). The immune response in infectious and inflammatory disease. *Primers in Biology*. USA: New Science Press. Ltd. Sinauer Associates: Inc. Publishers. Sunderland, MA,: 387.

de Oliveira, M. L., de Lima Silva C. C., Abe V. Y., Costa M. G., Cernadas R. A., Benedetti C. E. (2013). Increased resistance against citrus canker mediated by a citrus mitogen-activated protein kinase. *Mol. Plant-microbe Interact.* 26: 1190–1199.

Ding, J., Tasker, C., Valere, K., Sihvonen, T., Descalzi-Montoya, D. B., Lu, W., et al. (2013). Anti- HIV activity of human defensin 5 in primary CD4+ T cells under serumdeprived conditions is a consequence of defensin-mediated cytotoxicity. *PLOS ONE.* 8:e76038.

Dollet, M. (1984). Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). *Annual Review Phytopathology* 22: 115–125.

Duan, Y., Zhou, L., Hall, D.G., Li, W., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, C.M., Gabriel, D.W., Williams, K.P., Dickerman, A., Sun, Y., Gottwald, T. (2009). Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, **22**, 1011–1020.

Dutt, M.; Ananthakrishnan, G.; Jaromin, M.K.; Brlansky, R.H.; Grosser, J.W. (2012). Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants. *Tree Physiology*, Oxford, v.32, p.83-93.

Dutt, M., Barthe, G., Irej, M., Grosser, J. (2015). Transgenic citrus expressing an Arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PLoS One.* 10(9): e0137134.

Ehsani, R., Reyes De Corcuera, J. I., Khot, L. (2013). The potential of thermotherapy in combating HLB. *Resour. Mag.* 20(6):18–19

Esau, K., Cheadle, V. I., Gifford, E. M. (1953) Comparative structure and possible trends of specialization of the phloem. *Am. J. Bot.* 40, 9–19.

Etxeberria, E., Gonzalez, P., Dawson W. and Spann, T. (2011). An Iodine-Based Starch Test to Assist in Selecting Leaves for HLB Testing. <http://edis.ifas.ufl.edu/hs375>. Fecha de consulta: 14-09-2011.

Fagen, J.R., Leonard, M.T., Coyle, J.F., McCullough, C.M., Davis-Richardson, A.G., Davis, M.J., Triplett, E.W. (2014). *Liberibacter crescens* BT-1T gen. nov.; sp. nov., first cultured member of the *Liberibacter* genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 2461–2466.

Fan, J., Chen, C., Brlansky, R., Gmitter, Jr. F., Li, Z. G. (2010). Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*'. *Plant Pathol* 59:1037–1043

Fang, D., Roose, M. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 95(3):408–17.

FAO <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf> en <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/>

Fletcher, J. y Wayadanda, A. (2002). Fastidious vascular-colonizing bacteria. *Plant Health Instr*. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-02

Florack, D. E. A., Stiekema, W. J. (1994). Thionins-properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* 26: 25-37.

Folimonova, S. Y. y Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100: 949–958

Fonseca, O., N. Valera y C. Vásquez. (2007). Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara, Venezuela. *Entomotropica*. 22(3):145-152.

Furman, N., Kobayashi, K., Zaneck, M. C., Calcagno, J., Garcia M. L., Mentaberry A. (2013). Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding

sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. See comment in PubMed Commons below J Biotechnol. 167(4): 412–9.

García-Darderes. (2007). Distribución del huanglongbing (HLB) -Greening en el mundo. Direccion de Vigilancia y Monitoreo. SENASA. Argentina.

Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol. 3(9):710-720

Gmitter, F. G. (1995). Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. Plant Breed. Rev.13:345–376.

Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing, Annu. Rev. Phytopathol. 48:119–139.

Gottwald, T. R., Graham, J. H., Irey, M. S., McCollum, T. G., Wood, B.W. (2012). Inconsequential effect of nutritional treatments on Huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Prot.* 36:73–82

Gottwald, T. R., McCollum, T. G. (2017). Huanglongbing solutions and the need for anti-conventional thought. J Cit Pathol. [iocv\\_journalcitruspathology\\_36952](http://iocv_journalcitruspathology_36952).

Grudlewska, K., Sysakiewicz, M., Buda, K., Sobecka, M., Alska, E., y Ciesielska, N. (2014). Possibility of using defensins in medicine. J Health Sci, 4(7), 11– 17.

Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes S.O., Terán L.M. (2010). Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. Clinical Immunology. 135:1–11

Haapalainen, M. (2014). Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria *Annals of Applied Biology* Sep, Volume 165, Number 2, 172-198.

Halbert, S. E. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida, in *Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Work-shop*.

Halbert, S. E. y Manjunath, K. L. (2004). - Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A Literature Review and Assessment of Risk in Florida. *Florida entomologist* 87(3): 330-353.

Halbert, S. E., y Núñez, C. A. (2004). Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae), in the Caribbean basin. *Florida Entomologist* 87 (3).

Hao, G., Pitino, M., Duan, Y., Stover, E. (2016). Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact.* (2): 132–42. pmid:26554734

Hao, G., Stover, E., Gupta, G. (2016). Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and huanglongbing (HLB). *Front Plant Sci.*;7: 1078. pmid:27499757.

Higashiyama, T. (2010). Peptide signaling in pollen–pistil interactions, *Plant Cell Physiol.*, vol. 51.

Hinojosa-Moya, J. J., Xoconostle-Cázares, B., Toscano-Morales, R., Ramirez-Ortega, F. A., Cabrera-Ponce, J. L., & Ruiz-Medrano, R. (2013). Characterization of the pumpkin Translationally-Controlled Tumor Protein CmTCTP. *Plant signaling & behavior*, 8(12), e26477

Hoffman, M. T., Doud, M. S., Williams, L., Zhang, M. Q., Ding, F., et al. (2013). Heat treatment eliminates “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* 103(1):15–22

Hogenhout, S. A., Ammar, E. D., Whitfield, A.E. and Redinbaugh, M.G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 327–359.

Hu, J., Jiang, J., Wang, N. (2017). Control of Citrus Huanglongbing (HLB) via Trunk Injection of Plant Activators and Antibiotics. **Phytopathology**.

Hu, J., and Wang, N. (2016). Evaluation of the spatiotemporal dynamics of oxytetracycline and its control effect against citrus huanglongbing via trunk injection. *Phytopathology* 106:1495-1503.

Huang, J., Luo, X., Huang, B., Yao, X. (1999). Studies on citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama and its control. *Entomological Journal of East China* 8:26–34

Jagoueix, S., Bové J. M., Garnier M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 397-386.

Johnson, E.G., Wu, J., Bright, D.B., Graham, J.H. (2014). Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol.* 63 (2), 290–298.

Katz, S. H., and Weaver, W. W. (2003). *Encyclopedia of Food and Culture*. New York: Schribner.

Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., Wang, N. (2009). Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* **99**: 50–57.

Kishk, A., Hijaz, F., Anber, H. A. I., AbdEl-Raof, T. K., El-Sherbeni, A.-H. D., Hamed, S., & Killiny, N. (2017). RNA interference of acetylcholinesterase in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, increases its susceptibility to carbamate and organophosphate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 81–89. doi:10.1016/j.pestbp.2017.09.004

Klotman, M. E., Chang, T. L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6:447–56.



Koh, E. J., Zhou, L., Williams, D. S., 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.

Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T. K., and Kim, J.Y. (2014). Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *Journal of Plant Research*, 128(1), 37–47. doi:10.1007/s10265-014-0683-6

Kunkel LO. 1936. Heat treatment for the control of yellows and other virus diseases of peach. *Phytopathology* 26:809–30.

Kunta, M., Vilorio, Z., del Rio, H. S., and Louzada, E. S. (2014). Diverse DNA extraction methods and PCR primers for detection of Huanglongbing-associated bacteria from roots of 'Valencia' sweet orange on sour orange rootstock. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 178:23-30. 10.1016/j.scienta.2014.07.041

Laemmli, U. (1970) *Nature* 227, 680–685.

Lay, F. T., Anderson, M. A. (2005) Defensin--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* 6:85– 101.

León-Ramírez, E., Xoconostle-Cázares. B., Ruiz-Medrano, R. (2003) Comunicación intercelular a larga distancia vía el floema en plantas *Ciencia al día* (revista electrónica). <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen5/numero2/articulos/abstract3.html>

Leonard, M. T., Fagen, J. R., Davis-Richardson, A. G., Davis, M. J., Triplett, E. W. (2012). Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. *Standards in Genomic Sciences*, 7, 271–283.

Li, W., Cong, Q., Pei, J., Kinch, L. N., Grishin, N. V. (2012). The ABC transporters in *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 80(11):2614–28

Liefting, L. W., Weir, B. S., Pennycook, S.R., Clover, G. R. G. (2009). 'Candidatus Liberibacter solanacearum', a liberibacter associated with plants in the family Solanaceae. *Internal Journal of Systematic Evolution and Microbiology*, **59**, 2274–2276.

Lin, M., Belanger, H., Lee, Y. Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Miura, E., Xoconostle-Cázares, B., Gendler, K., Jorgensen, R. A., Phinney, B., Lough, T. J., Lucas W. J. (2007). Flowering Locus T protein may act as the long-distance florigenic signal in the Cucurbits. *Plant Cell*.19:1488–1506.

Lin, H., Doddapaneni, H., Munyaneza, J. E., Civerolo, E. L., Sengoda, V. G., Buchman, J. L., Stenger D. C. (2009). Molecular characterization and phylogenetic analysis of 16S rRNA from a new “Candidatus Liberibacter” strain associated with zebra chip disease of potato (*Solanum tuberosum* L.) and the potato psyllid (*Bactericera cockerelli* Sulc). *Journal of Plant Pathology*, **91**, 215–219.

Liu, L., Zhao, C., Heng, H. H., Ganz, T. (1997). The human beta-defensin-1 and alpha- defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* 43:316–20.

Liu, Y., Heying, E., y Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehen. Rev. Food Sci. Food Safety* 11:530–545.

Liu, Y. H. and Tsai, J. H. (2000). Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Applied Biol.* 137:210-216.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *methods*, 25(4), 402-408.

Lopes, S. A., Luiz, F. Q. B. F., Martins, E. C., Fassini, C. G., Sousa, M. C., et al. (2013). “Candidatus Liberibacter asiaticus” titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. *Plant Dis.* 97(12):1563–70

Lopes, S., Bertolini, E., Frare, G., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., et al. (2009). Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. *Phytopathology*, 99, 301–306.

Louzada, E. S., Vazquez, O. E., Braswell, W. E., Yanev, G., Devanaboina, M., & Kunta, M. (2016). Distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Above and Below Ground in Texas Citrus. *Phytopathology*, 106(7), 702-709.

Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S. R., Helariutta, Y., He, X. Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., Patrick, J. W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A. F., Grusak, M. A., Kachroo, P. (2013). The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol*, 55:294-388.

Mafra, V., Martins, P. K., Francisco, C. S., Ribeiro-Alves, M., Freitas-Astúa, J., Machado, M. A. (2013). *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genom* 14: 247–247.

Manjul, D., Gary, B., Michael, I., Jude, G. (2015) Transgenic citrus expressing an arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PloS one* 10: e0137134.

Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S., Lee, R. F. (2008). Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98:387–396.

Mathews, M., Jia, H. P., Guthmiller, J. M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G. K., Tack, B. F., McCray, P. B., Jr. (1999). Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun*. 67: 2740–2745

Mayorga Castañeda, F. J. (2010). Acuerdo por el que se dan a conocer las medidas fitosanitarias que deberán aplicarse para el control del huanglongbing

(*Candidatus Liberibacter* spp.) y su vector. Diario Oficial de la Federación. México. Lunes 16 de agosto de 2010.

McManus, P., Jones, A. (1994). Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathol* 84: 627-632

McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Ann Rev Phytopatho* 40: 443-465.

Mccollum, G. and Baldwin, E. (2017). Huanglongbing: Devastating Disease of Citrus. *Horticultural Reviews*. 315-361. 10.1002/9781119281269.ch7.

McCutcheon, J. P., Moran, N. A. (2011). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(1):13

Mead, F.W. and T.R. Fasulo. (2017) (re-revisado, publicación original 1998). Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae) <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN16000.pdf>

Mendes, B. M. J., Cardoso, S. C., Boscariol-Camargo, R. L., Cruz, R. B., Mourão Filho, F. A. A., Bergamin Filho A. (2010). Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. *Plant Pathol.* 59: 68–75.

Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of citrus from molecular markers. *Trends Genet.* 17:536–540.

Munir, S., He, P., Wu, Y., He, P., Khan, S., Huang, M. (2017) Huanglongbing Control: Perhaps the End of the Beginning. *Microbial Ecology*. Volume 48

Murray, R. G. E., Schleifer K. H. (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *International Journal of Systemic Bacteriology* 44: 174-176.

Murray, R. G. E. & Stackebrandt, E. (1995). Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. *Int J Syst Bacteriol* 45, 186–187.

Musetti, R., Paolacci, A., Ciaffi, M., Tanzarella, O. A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M., Osler, R. (2010). Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* **100**: 390–399.

National Research Council. (2010). *Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening Disease*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12880>.

Nakabachi A, Nikoh N, Oshima K, Inoue H, Ohkuma M, et al. 2013. Horizontal gene acquisition of Liberibacter plant pathogens from a bacteriome-confined endosymbiont of their psyllid vector. *PLOS ONE* 8(12):e82612

Nwugo, C. C., Duan, Y., Lin, H. (2013<sup>a</sup>). Study on citrus response to Huanglongbing highlights a down-regulation of defense-related proteins in lemon plants upon ‘Ca. Liberibacter asiaticus’ infection. *PLoS ONE* **8**: doi: 10.1371/journal.pone.0067442

Nwugo, C. C., Lin, H., Duan, Y., Civerolo, E. L. (2013<sup>b</sup>). The effect of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. *BMC Plant Biol* 13: 59-59.

Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. B., Broekaert, W. F. (1995). Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*

Pacheco, C. J., Samaniego, R. J. y Fontes, P. A. (2012). Tecnología para el manejo integrado del psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) en cítricos en Sonora. Folleto Técnico No. 88. INIFAP.

Polek, M., G. Vidalakis, and K. Godfrey. (2007). Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (Citrus greening). ANR. Publ. 8218. University of California. Davis.

Porcel, B., Denoeud, F., Opperdoes, F., Noel, B., Madoui, M., Hammarton, T., Field, M., Da Silva, C., Couloux, A., Poulain, J., Katinka, M., Jabbari, K., Aury, J., Campbell, D., Cintron, R., Dickens, N., Docampo, R., Sturm, N., Koumandou, V., Fabre, S., Flegontov, P., Lukeš, J., Michaeli, S., Mottram, J., Szoor, B., Zilberstein, D., Bringaud, F., Wincker, P., Dollet, M. (2014). The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants *PLOS Genetics* 10: e1004007.

Reinking, O. A. (1919). Diseases of economic plants in southern China. *Philippine Agricultural* 8: 109-135.

Roistacher, C. N. (1996). The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand, p. 279-285. In: Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside, CA.

Roberts, R., Steenkamp, E. T., Pietersen, G. (2015). Novel lineages of 'Candidatus *Liberibacter africanus*' associated with native Rutaceae hosts of *Trioza erytreae* in South Africa. *Intern J Syst Evol Microbiol* 65: 723–731.

Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S. M., y Holck, A. L. (2005). Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1018–1024.

Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W. J., (1999). Phloem Long-Distance Transport of CmNACP-1 mRNA: Implications for Supracellular Regulation in Plants. *Development* 126 (20), 4405-4419.

Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B. and Kragler, F. (2004) The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 641–650.

SAGARPA. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350).

SAGARPA. 2012. México, entre los líderes en producción de cítricos a nivel mundial.

SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017 – 2030.

Salcedo, D., Hinojosa, R., Mora, G., Covarrubias, I., DePaolis, F., Cíntora, C., y Mora, S. (2010). Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. IICA. Oficina del IICA en México. México, D.F. En línea: <http://portal.hlbcolima.org/descargas/item/59-cadena-citricola-mexicana.html>

Salcedo, B. D., González, H. H., Rodríguez, L. E., Vera, V. E., Múzquiz F. C., Hurtado A. A. (2012). Evaluación de la Campaña contra el HLB en 2008, 2009 y 2010. *Publicación Especial IICA, SAGARPA, SENASICA*. México, D.F. 126 pp.

Santivañez, T., Mora-Aguilera, G., Díaz-Padilla, G., López-Arrollo, J. I. y Vernal-Hurtado, P. (2013). CITRUS. Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 60 Pp.

Sechler, A., Schuenzel, E.L., Cooke, P., Donnua, S., Thaveechai, N., Postnikova, E., Stone, A.L., Schneider, W.L., Damsteegt, V.D., and Schaad, N.W. (2009). Cultivation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus*, and *Ca. L. americanus* associated with huanglongbing. *Phytopathology* **99**: 480-486.

Selsted, M. E., Ouellette, A. J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **6**:551–7.

- Shen, W., Cevallos-Cevallos, J. M., Nunes da Rocha, U., Arevalo, H. A., Stansly, P. A., et al. (2013). Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. *Eur. J. Plant Pathol.* 137(4):727–42
- Shen, W., Halbert, S. E., Dickstein, E., Manjunath, K. L., Shimwela, M. M., van Bruggen, A. H. C. (2013). Occurrence and in-grove distribution of citrus Huanglongbing in North Central Florida. *J Plant Pathol* **95**: 361–371
- Schneider, J. J., Angela Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H.C. (2005). Human defensins. *J Mol Med.* 83: 587–595.}
- Schröder, J. M., Harder, J. (1999). Human beta-defensin-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 31 (6): 645–51.
- Schultz, K. M., Merten, J. A., Klug, C. S. (2011). Effects of the L511P and D512G mutations on the *Escherichia coli* ABC transporter MsbA. *Biochemistry* 50(13):2594–602
- Sjolund RD (1997) The phloem sieve element: a river runs through it. *Plant Cell* 9:1137–1146.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2008. Anuario estadístico de la producción pesquera.
- Song, X., Bhattarai, K., Lv, D., Gao, F., Ying, X. (2017). Can CRISPR Win the Battle against Huanglongbing?. *Journal of Plant Pathology & Microbiology.* 08. 10.4172/2157-7471.1000422.
- Soto, E., Espinoza, J., Nien, J. K., Kusanovic, J. P., Erez, O., Richani, K., Santolaya-Forgas, J., Romero, R. (2007). Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 20 (1): 15-22. 10.



Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., y Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 1(4), 2019–2025.

Spiegel-Roy, P. y Goldschmidt, E. E. (1996). *Biology of Citrus*. Cambridge University Press. p. 4

Spratt, B. G., Cromie, K. D. (1988). Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 10: 699-711.

Stansly, P. A., Arevalo, H. A., Qureshi, J. A., Jones, M. M., Hendricks, K., et al. (2014). Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by Huanglongbing. *Pest Manag. Sci.* 70(3):415–26

Statista. 2012. Global fruit production in 2012 by variety. Accessed on 20 April, 2015 from <http://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/>

Stotz, H.U., Spence, B., Wang, Y., (2009). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Mol. Biol.* 71 (1-2), 131-143.

Su, H. (2011). A Rapid, Less-Costly and Accurate Detection of Citrus Greening (HLB) Pathogen in the Aspac Region (Year 2).<http://www.agnet.org/library/ac/2008m/>: Fecha de consulta:14-09-2011.

Tam, J. P. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals* 8: 711-757.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3rd. ed.). Sinauer, New York, NY.

Teixeira, D., do Carmo, Dane, J. L., Eveillard, S., Martins, E.C., Jesus Junior, W. C. de, Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., Bové, J. M., (2005). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular Cellular Probes* 19: 173-179.

Teixeira, D.C., Eveillard, S., Sirand-Pugnet, P., Wulff, A., Saillard, C., Ayres A. J., Bové, J. M. (2008). The *tufB–secE–nusG–rplKAL–rpoB* gene cluster of the liberibacters: sequence comparisons, phylogeny and speciation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**, 1414–1421.

Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P. and Broekaert, W.F. (2000). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 54–61.

Thomma, B. P., Cammue, B. P. & Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta* **216**, 193–202.

Thompson, S., Fletcher, J.D., Ziebell, H., Beard, S., Panda, P., Jorgensen, N., Fowler, S.V., Liefting, L.W., Berry, N., Pitman, A.R. 2013. First report of 'Candidatus Liberibacter europaeus' associated with psyllid infested Scotch broom. *New Disease Reports*, **27**, 6.

Tyler, H. L., Roesch, L. F. W., Gowda, S., Dawson, W. O., Triplett, E. W. (2009). Confirmation of the sequence of “Candidatus Liberibacter asiaticus” and assessment of microbial diversity in Huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22(12):1624–34

UNCTAD. (2011). Citrus Fruit Market. Assessed on 21 April 2015 from [http://www.unctad.info/en/ Infocomm/Agricultural\\_Products/Citrus-fruit/market/](http://www.unctad.info/en/Infocomm/Agricultural_Products/Citrus-fruit/market/)

USDA. (2017). *CITRUS: October forecast*.

USDA National Agricultural Statistics Service. (2015). October forecast: Maturity test results and fruit size. United States Department of Agriculture, Washington, D.C. Published online. [http://www.nass.usda.gov/Statistics\\_by\\_State/Florida/Publications/Citrus/cit/2015-16/cit1015.pdf](http://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publications/Citrus/cit/2015-16/cit1015.pdf).

Van der Merwe, A.J. and F.G. Andersen. (1937). Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Fmg. S. Afr.* 12, 439-440.

von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., et al. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 7:173

Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J., Valkonen, J. P. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Science* 181, 355–363.

Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L. T., Martins, J. Jr. (2017). The *Candidatus Liberibacter*–Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control *Annual Review of Phytopathology*, Volume 55, Number 1, 451-482

Wang, N., Trivedi, P. (2013). Citrus huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology* 103: 652-665.

Wang, W., Owen, S. M., Rudolph, D. L., Cole, A. M., Hong, T., Waring, A. J., et al. (2004). Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol.* 173:515–20.

Witkowska, D., Bartyś, A., Gamian, A. (2008). Defensyny i katelicyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Postepy Hig Med Dosw.* 62: 694-707

Wong, J. H., Ng, T. B. (2005). Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides.* 26:1120–1126.

Wong, J. Xia, L. y Ng, T. B, (2007). A Review of Defensins of Diverse Origins. *Current protein & peptide science.* 8. 446-59.

Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulegue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., et al. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100: 8880–5.

Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., et al. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat. Biotechnol.* 32, 656–662.

Wu, G. A, Terol, J., Ibanez, V., et al (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* 554 (7692): 311-316.

Xia, Y., Ouyang, G., Sequeira, R. A., Sequeira, R., Sequeira, Y., et al. (2011). A review of Huanglongbing (citrus greening) management in citrus using nutritional approaches in China. *Plant Health Prog.*

Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A.C., Ruiz-Medrano, R. (2016). Phloem Long-Distance Trafficking of RNAs and Proteins. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK.

Xoconostle-Cázares B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H. L., Monzer, J., Yoo, B. C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., Lucas, W. J. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283:94–98.

Yang, L., Hu, C., Li, N., Zhang, J., Yan, J., Deng, Z: (2011). Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. *Plant Mol Biol.* 75(1–2): 11–23. pmid:20972821

Yeaman, M. R., Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 55:27–55.

Zhang, X., Francis, M. I., Dawson, W. O., Graham, J. H., Orbovic, V., Triplett, E. W., et al. (2010). Over-expression of the *Arabidopsis NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.* 128: 91–100.

Zhang, M., Yang, C., Powell, C. (2015) Application of Antibiotics for Control of Citrus Huanglongbing. *Adv Antibiotics Antibodies.*

Zhang, M., Guo, Y., Powell, C. A., Doud, M. S., Yang, C., Duan, Y. (2014). Effective antibiotics against “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PLOS ONE* 9(11):e111032

Zhao, H., Sun, R., Albrecht, U., Padmanabhan, C., Wang, A., Coffey, M. D., Girke, T., Wang, Z., Close, T. J., Roose, M., Yokomi, R. K., Folimonova, S., Vidalakis, G.,

Rouse, R., Bowman, K. D., Jin, H. (2013). Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus huanglongbing disease. *Mol Plant* **6**: 301–310

Zou, X., Jiang, X., Xu, L., Lei, T., Peng, A., He, Y., et al. (2016). Transgenic citrus expressing synthesized cecropin B genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Mol Biol*.

## **ANEXO 1**

**Unidad de expresión: CmPP16-defensina = 2134bp**

**Borde izquierdo del T-DNA de *A. tumefaciens* (LB)**

CGGTTAAAACCCAGTACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTG  
TCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAGCCAAC  
AGCTCCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCACTCGATACAGGCAGCC  
CATAG

**Promotor 35S largo**

*ATTAGCCTTTTCAATTTCAAGAAAGAATGCTAACCCACAGATGGTTAGAGAGGC  
TTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAA  
TCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAGATTGAGGACTAAC  
TGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCA  
GTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGG  
AGTCTCTAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTC  
AAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACA  
GAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGC  
ACGACACACTTGTCTACTCCAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA  
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATT  
CCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTG  
GCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC  
TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTG  
GAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAT  
CTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTT  
CCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACG*

**Gen que codifica para 16K ortóloga en cítricos**

ATGGGGATGGGAATGATGGAGGTCCATTTGATTAGTGGTAAAGGACTTCAAG  
CCCACGACCCTCTTAATAAACCAATTGACCCTTATGCTGAGATCAACTTCAAG

GGCCAAGAACGCATGAGCAAAGTTGCTAAAAATGCAGGACCAAATCCATTATG  
GGATGAGAAATTTAAATTCCTAGCCGAGTACCCTGGGAGCGGTGGTGACTTC  
CATATCTTATTCAAGGTCATGGACCATGACGCTATAGATGGTGATGATTACATT  
GGCGATGTCAAATAGATGTCAAGAATTTATTAGCGGAAGGAGTTAGAAAAGG  
AAAGTCGGAGATGCCGCCTAGAATGTACCATGTCTTAGCACACAAAATCCACT  
TCAAGGGAGAAATTGAAGTTGGAGTGTCTTCAAGCTGCAAGGCGGCGGGG  
GATGTGGAGGATGTTACCCATGGGAAAACCTTAGCGGTGGTGGTGGTAGCG  
GTGGTGGTGGTAGCGG

**Polilinker:**

TGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGCTGCTGCT

**Defensina humana con uso de codones de cítricos:**

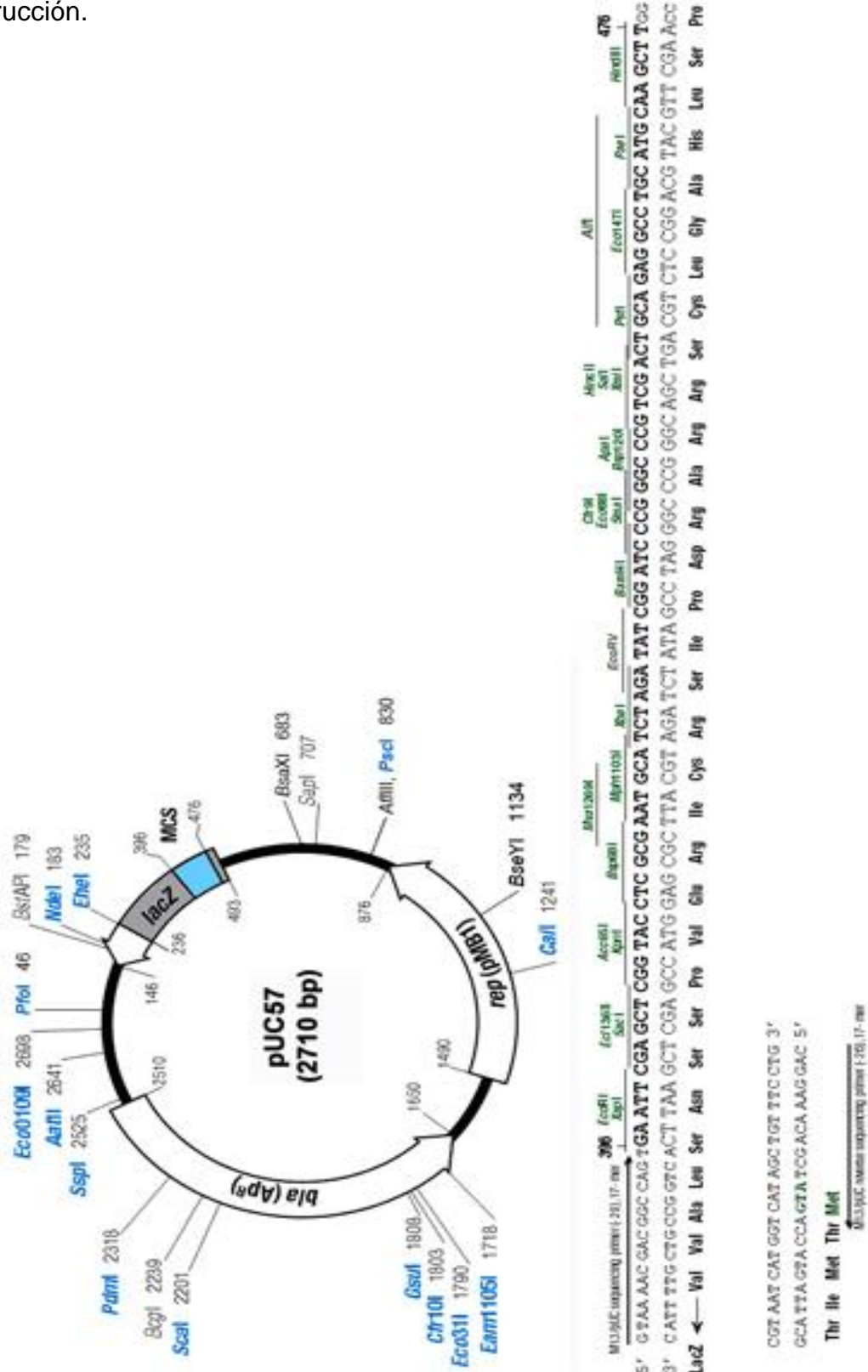
ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTCAGCTTCCTTTTCATTTTCCTTATGCCACTTC  
CAGGTGTTTTTCGGTGGTATTGGTGATCCAGTTACATGCCTTAAGAGCGGTGCT  
ATTTGCCATCCAGTTTTCTGCCAAGAAGATATAAGCAAATTGGTACATGCGG  
TCTTCCAGGTACAAGATGCTGCAAGAAGAAGTAG

**Terminador NOS y borde derecho del T-DNA de *A. tumefaciens* (RB).**

GATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGT  
CTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTA  
ACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGC  
AATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATA  
AATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTTTGGATCTCCTGTGGT  
TGGCAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTCACGCCCTTTTAAATATCCGATTAT  
TCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACA  
CTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGCTAG

## ANEXO 2

Mapa de restricción del vector pUC57 utilizado para la clonación de la construcción.







## Localized expression of antimicrobial proteins mitigates huanglongbing symptoms in Mexican lime



Miguel-Angel Guerra-Lupián<sup>a</sup>, Roberto Ruiz-Medrano<sup>a</sup>, José-Abrahán Ramírez-Pool<sup>a</sup>, Francisco-Arturo Ramírez-Ortega<sup>a</sup>, José-Abel López-Buenfil<sup>a,b</sup>, Emiliano Loeza-Kuk<sup>c</sup>, Oscar Morales-Galván<sup>b,1</sup>, Claudio Chavarin-Palacio<sup>b</sup>, Jesús Hinojosa-Moya<sup>d</sup>, Beatriz Xoconostle-Cázares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Zacatenco, 07360, CDMX, Mexico

<sup>b</sup> Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria, Carretera Federal Pachuca-México Km 37.5, Centro, 55740, Tecámac de Felipe Villanueva, Estado de México, Mexico

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Campo Experimental Mocochoá, Carretera Mérida-Motul km 25, Mocochoá, Yucatán, C.P. 97454, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Antimicrobial proteins  
*Candidatus Liberibacter asiaticus*  
 Citrus greening disease  
 Huanglongbing  
 Mexican lime  
 Phloem biology

### ABSTRACT

Citrus huanglongbing (HLB) is a devastating disease associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus* spp. (CLas), a bacterium restricted to the sieve tube system of the phloem that is transmitted by the psyllid vector, *Diaphorina citri*. In this study, the human antimicrobial peptides, lysozyme and  $\beta$ -defensin 2, were targeted to the vascular tissue of Mexican lime (*Citrus x aurantifolia* [Christm.] Swingle) by fusion to a phloem-restricted protein. Localized expression was achieved, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the stem, which led to protein expression and mobilization within the vascular tissue of heterotrophic tissues. HLB-infected plants were monitored for 360 days. Lower bacteria titers were observed in plants expressing either  $\beta$ -defensin 2, lysozyme, or the combination thereof, and these plants had increased photosynthesis, compared to untreated control trees. Thus, targeting of antimicrobial proteins to the vascular tissue was effective in decreasing CLas titer, and alleviating citrus greening symptoms. Based on these findings, this strategy could be used to effectively treat plants that are already infected with bacterial pathogens that reside in the phloem translocation stream.

### 1. Introduction

Huanglongbing (HLB; yellow dragon disease in Chinese) is a devastating citrus disease with a worldwide distribution, especially in citrus-producing countries, such as Brazil, USA, China and Mexico, among others. This disease is quite destructive, causing severe loss in production, since commercial cultivars are highly susceptible. The symptoms associated to HLB are asymmetric yellowing of leaves blotchy mottle, decrease in tree productivity, asymmetric colored fruits, aborted seeds and, eventually, tree death. This disease has spread rapidly in both tropical and subtropical regions in the world and is currently considered the main threat to the citrus industry (Bové, 2006; da

Graça et al., 2016).

HLB is associated to the bacterium *Candidatus Liberibacter* (ca. L.), of which there are three species: ca. L. *asiaticus* (CLas), ca. L. *americanus* (CLam) and ca. L. *africanus* (CLaf) and CLas and CLam are transmitted by the psyllid insect *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), while CLaf is transmitted by the triozid *Trioza erytreae*. This vector feeds from early larval stages on young citrus shoots, where it is often not exposed to applied pesticides. Thus, vector control, while otherwise deemed a viable strategy, has not been effective. Once HLB is transmitted and infection established, bacteria are restricted to the vascular tissue, particularly in mature phloem, i.e., within the companion cells (CC) and sieve elements (SE), which form CC-SE complexes, and are more

\* Corresponding author.

E-mail address: [bxoconos@cinvestav.mx](mailto:bxoconos@cinvestav.mx) (B. Xoconostle-Cázares).

<sup>1</sup> Present address: Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, C.P. 35230.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.012>

Received 8 January 2018; Received in revised form 16 July 2018; Accepted 24 August 2018

Available online 05 September 2018

0168-1656/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

concentrated in source, photosynthetically active tissues (Li et al., 2009; Ding et al., 2015)

CLas infects members of the Rutaceae family, and the close species ca. *L. psyllaurosus* has been detected in Solanaceous plants, whereas a phytoplasma has been also associated to ca. *L.* in Brazil and China, being both phloem-restricted pathogens. Phylogenetic analysis of ca. *L.* based on its genome shows that it belongs to the Rhizobacteria clade, which are all Gram-negative bacteria with cell wall-containing peptidoglycan; a finding confirmed by ultrastructural analysis, congruent with a Gram-negative cell wall organization (Bové, 2006). Thus, CLas is potentially susceptible to cell-wall hydrolases, such as lysozyme.

The accumulation of CLas in the CC-SE complex causes a substantial accumulation of callose ( $\beta$ -1,3 glucans) in mature, functional sieve tubes, thereby blocking both plasmodesmata (PD) interconnecting CC-SE complexes and sieve plate pores (SPP), resulting in a disruption to normal photosynthate translocation from source to sink tissues (Bové, 2006; Koh et al., 2012; Johnson et al., 2014). Additionally, CLas likely secretes virulence factors that may also affect phloem function Hao et al., 2013; Prasad et al., 2016; Wang et al., 2017).

A range of strategies have been employed to control CLas infection, including the use of antibiotics, such as tetracycline (Bové, 2006). An additional problem is that, since CLas resides in the phloem, externally applied products are mostly excluded from this vascular tissue, although stem injection, inducers of defense response and antibiotics may, to some degree, circumvent this limitation (Hu et al., 2018). In any event, more sustainable strategies are needed to control HLB. For example, the central regulator of plant immunity from *Arabidopsis*, NPR1, has been overexpressed in citrus plants to successfully control HLB (Dutt et al., 2015). Similarly, external application of defense-response inducers has shown promise in decreasing CLas titer in field trials (Li et al., 2016). Interestingly, Canales et al. (2016) applied epibrassinolide to HLB-infected citrus plants under both greenhouse and field conditions, registering a reduction of the CLas titers. The antimicrobial lysozyme (1,4- $\beta$ -*N*-acetylmuramidase C) contains 148 amino acids and belongs to the family of glycosyl hydrolases. Its function is bacteriolytic, it carries out the hydrolysis of  $\beta$ 1,4- bonds between the *N*-acetylmuramic (NAM) and *N*-acetyl-D-glucosamine (NAG) residues of the peptidoglycan present in the bacterial cell wall (Uniprot Data base, 2018).  $\beta$ -Defensins have broad-spectrum activity against bacteria creating voltage-dependent channels in bacterial membranes that allow the influx of water. The presence of six cysteines and three intramolecular disulfide bridges present in the amphipathic molecule interacts with bacterial membranes, destabilizing it by creating pores. Increased osmotic pressure ruptures the bacterial membranes.  $\beta$ -defensins can also block cell wall biosynthesis by binding to lipid II, the peptidoglycan building block (Patel and Akhtar, 2017). Defensins from spinach displaying a low oral toxicity expressed in Citrus plants, showed promising results (Mirkov, Gonzalez-Ramos, 2012). Plant thionin has also provided mitigation of HLB symptoms (Hao et al., 2016).

Another strategy is the expression of antimicrobial peptides in the vascular tissue, more specifically in the CC-SE complex. The vascular tissue is comprised of xylem, which conducts water and mineral nutrients from root to shoots, and the phloem, which translocates photoassimilates, minerals, proteins and nucleic acids, from source to sink tissues (Lucas et al., 2013; Xoconostle-Cázares et al., 2016). The CC-SE complex is interconnected via specialized branched PD, and specific proteins, synthesized in the CC, are transported through these PD into the enucleate SE. One such protein, CmPP16 from pumpkin (*Cucurbita maxima*), is thought to play a role in response to stress (Xoconostle-Cázares et al., 1999; Ramírez-Ortega et al., 2014). This phloem protein could serve as a vehicle to target candidate fusion proteins for delivery into the sieve tube system. This protein has been tested by its capacity to facilitate the translocation of both plant and viral RNA and proteins in mesophyll cells, as well as in the boundary CC-SE, to reach long distant tissues through the phloem stream (Xoconostle-Cázares et al.,

1999, 2000; Aoki et al., 2005). The supracellular movement of proteins and RNAs may act as gene regulatory networks involved in plant growth, defense, and crop yield at the whole-plant level (Ham and Lucas, 2017).

Although in planta expression of proteins with antimicrobial activity has great potential to control CLas, the challenge is to provide access of such proteins to the highly selective phloem domain of the sieve tube system. In order to overcome this limitation, two antimicrobial proteins, human lysozyme and human  $\beta$ -defensin 2 were translationally fused to CmPP16 and transiently expressed in Mexican lime (*Citrus x aurantifolia* [Christm.] Swingle). The results presented here demonstrate that plants expressing both fusion proteins exhibited a significant decrease in CLas titer, amelioration of symptoms and photosynthetic activity similar to healthy control plants. Therefore, this strategy could be used to control diseases caused by pathogens that reside exclusively in the vascular tissue.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

One-year-old HLB-symptomatic Mexican lime plants were naturally infected in Mochochá, Yucatán State, Mexico; citrus greening entered to Mexico in Yucatán State in 2013 (SENASICA, 2018). CLas was quantified in these plants, while Citrus Tristeza Virus (CTV) was not detected in the young trees using molecular detection methods (data not shown). Buds from the infected Mexican Limes were then grafted onto *Citrus volkameriana* root stocks, and grown in pots in a greenhouse at the Mochochá Experimental Station, INIFAP, Mochochá, Yucatán, México. Grafted plants were allowed to grow and CLas content was determined in order to confirm that these were infected with CLas. Nine-month-old plants, with an approximate height of one meter, with clear HLB symptoms were then subjected to localized genetic transformation and expression analysis. In parallel grafting assays, healthy buds from certified Mexican lime were also obtained, and employed as isogenic controls.

### 2.2. Plasmid construction

*Agrobacterium tumefaciens* binary vector was designed to contain an expression cassette harboring the DNA sequences for human  $\beta$ -defensin 4 A precursor ( $\beta$ -defensin 2; Genbank accession No. NP\_004933.1) or the processed form of human lysozyme C chain A (Genbank accession No. AAA59535.1), with citrus-optimized codon usage and translationally fused to the pumpkin CmPP16 open reading frame (ORF) (Genbank accession No. AAD05496.1) to yield CmPP16-Def and CmPP-Lys, respectively. The ORF is driven by the CaMV 35S constitutive promoter and the T-Nos terminator. The complete expression unit was flanked by the Left and Right borders (LB, RB) from *A. tumefaciens* T-DNA. The synthetic construct was assembled by Genscript Corp. (Piscataway, NJ) and cloned into the pUC57 vector, which harbors the ampicillin resistance gene. As a control, it was employed *A. tumefaciens* harboring the pMON3804 vector (kindly provided by Dr. Carmen Quinto, Instituto de Biología UNAM, Cuernavaca, México), which contains the *uidA* gene (GUS) driven by the CaMV 35S promoter.

The binary plasmids were introduced by electroporation into *A. tumefaciens* C58C1, using an Equibio electroporator and 1 mm cuvettes (Equibio, Middlesex, UK) which was then cultured at 28 °C for 48 h in LB medium containing 100 mg/l carbenicillin. Bacterial cells were pelleted at 5000  $\times$  g for 10 min and resuspended in the same volume of inoculation medium (IM), consisting of MS salts, 2% sucrose, 20  $\mu$ M Indolacetic Acid, 0.2% Silwett 40 and 140  $\mu$ M Acetosyringone.

### 2.3. Experimental design

Fifteen plants with HLB symptoms were used for each of the

following treatments: lysozyme, defensin, lysozyme plus defensin, a *GFP-uidA* fusion as a marker gene and mock inoculation, in addition 15 healthy isogenic plants were also employed. At least four branches were assayed for transient expression in each plant, and three leaves from each plant. Fully expanded (source) and young (sink) leaves were pooled and analyzed in triplicate for transcript analysis, photosynthesis measurements and CLas quantification.

#### 2.4. Localized genetic transformation

Grafted, HLB-symptomatic plants were selected for localized expression. Mexican lime grafted onto CLas-infected *C. volkameriana* rootstocks were agro-infiltrated as follows. An area of 2–5 cm<sup>2</sup> on the plant stem was scraped with a sterile blade to remove the dead bark tissue to expose the underlying green living tissue. A cotton swab soaked in inoculation medium containing the recombinant *A. tumefaciens* was then applied to the exposed surface; the cotton was immobilized with plastic wrap and the entire plant was covered with a large clear plastic bag for 48 h to maintain high humidity and favor the genetic transformation and emergence of newly transformed tissue. After incubation, the cotton swab was removed and plants were irrigated only with water to avoid masking HLB symptoms. Plants were then analyzed; biopsies of local and distant tissues were assessed for the presence of both the DNA construct and defensin and lysozyme encoding transcripts.

For plants in which GFP-associated fluorescence was monitored, healthy Mexican lime plants 60 cm in height were used for transformation with *A. tumefaciens* C58C1, harboring a *CmPP16-Defensin-GFP* fusion, essentially as previously described.

#### 2.5. Transgene detection by PCR

Genomic DNA obtained from 100 mg of mature and young leaves from control and agro-infiltrated Mexican lime was used as template to determine the presence of the transgene, using the DNeasy extraction Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) by end point PCR with the following primers: DEF forward 5'-ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTC AGC-3', DEF reverse 5'-CTACTTCTTCTTGACGATCTGTACC-3', to amplify a 180 bp fragment, corresponding to the human  $\beta$ -defensin gene fragment; LYS forward 5'-AGGTTTTCGAAAGATCGGAAGCTTGCTA GAA-3', LYS reverse 5'-AAACACCGCAACCTTGAACATATTGTCTGC-3', to amplify a 400 bp fragment corresponding to the human lysozyme gene fragment. The reactions were performed on a T-1000 thermal cycler (Göttingen, Germany), under the following conditions: 3 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 35 s at 94 °C; 35 s at 58 °C and 30 s at 72 °C, with a final extension step at 72 °C, 3 min.

Transgene copy number per Citrus genome for *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys* and the combination of both was determined by quantitative PCR (qPCR). Leaf DNA was extracted from tissue samples collected 60 days after agro-infiltration; as an endogenous control, a 200 bp fragment of the *C. sinensis* COX gene was employed. The above-mentioned primers were used, in combination with SYBR Green as fluorophore (Sigma-Aldrich, Mexico); the reactions were set on a Corbett Rotorgene RG-3000 apparatus (Corbett Research, Australia), following the manufacturer's instructions. The cycle conditions used were as follows: 94 °C for 20 s followed by 40 cycles at 94 °C for 1 s and 58 °C for 40 s.

#### 2.6. RNA isolation

Leaf RNA from young shoots from control and treated plants was obtained as follows. The petiole was first removed and the leaf blade was then ground with a TissueLyser apparatus and RNA then purified with an RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was then incubated with DNaseI (Promega; Madison WI) to remove contaminant DNA for real-time quantitative

reverse transcriptase coupled-PCR (qRT-PCR) analysis.

#### 2.7. RNA detection and quantification

qRT-PCR was performed with a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA). Briefly, DNase I-treated RNA was added to a 20 µl reaction mixture containing 10 µl of Kapa SYBR FAST qPCR master mix (Sigma-Aldrich), 10 µM primers, 200 ng of total RNA and 1 µl ROX high (Biorad, Hercules CA). Assay mixture was prepared with the primers: Defensin mRNA: qDef5' 5'-TATGCCACTTCCAGGTGTTT-3', qDef3' 5'-AAACTGGATGGCAAATAGCAC-3'; Lysozyme mRNA: qLys5' 5'-CAC CAGGTGCTGTTAATGCT-3', qLys3' 5'-ATTTCTCCAAGCAACCCAAG-3' and the endogenous *C. sinensis* COX mRNA: qCox5 5'-GTATGCCACGT CGCATTCCAGA-3', qCox3' 5'-GCCAAAAGTCTAAGGGCATTTC-3' (Sigma-Aldrich Mexico). RT-PCR conditions were: 50 °C for 30 min, 94 °C for 2 min and 40 cycles of 94 °C for 15 s, 58 °C for 35 s. Normalized mRNA accumulation was calculated employing the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001), obtained with the StepOne Plus software (Applied Biosystems).

#### 2.8. Confocal microscopy

Leaves from Mexican lime, transformed with the *CmPP16-Def-GFP* fusion construct were collected, sectioned manually employing a surgical blade on a glass slide, to obtain section of 3 mm. Sections were submerged in water and analyzed immediately with a Leica confocal laser-scanning microscope (model TC-SP5/MO-TANDEM) at the LanSE facility in CINVESTAV-Mexico City, using a krypton/argon laser and the following filter settings: 488 nm excitation and 525 nm emission for green fluorescence, and 580/665 nm for chlorophyll autofluorescence. All images were recorded and analyzed with Leica Las AF software, followed by processing with Photoshop 8.0 software (Adobe), as described previously (Xoconostle-Cázares et al., 1999).

#### 2.9. Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical assays were performed, as previously reported (Ruiz-Medrano et al., 1999), with the following modifications: Fresh stem and leaf tissue, sampled sixty-days after local transformation with *A. tumefaciens*, were immersed in fixative solution (FAA; 3.7% formaldehyde, 5% acetic acid and 50% ethanol) for 12 h and then dehydrated in an ethanol series (30, 50, 70 and 90%). Tissue was then immersed overnight in 95% ethanol with 0.01% Safranin O. Two changes with 100% ethanol, followed by two changes with acetone, for 30 min each, were performed, then followed by an overnight incubation with 100% CitriSolv and then gradual replacement with melted paraffin. 5 µm semi-thin cross sections were obtained using a rotary microtome HM 315. Rehydrated sections were blocked with PBS, containing 1% BSA and incubated overnight with a 1:1000 dilution of anti-human defensin polyclonal antibody, raised in rabbit (200 µg/mL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX). Sections were then incubated in a secondary antibody (anti-rabbit IgG coupled to alkaline phosphatase, Santa Cruz Biotechnology) and rinsed under stringent conditions with PBS-Tween 20. The interaction was treated with NBT/BCIP until a blue signal was observed and the enzymatic reaction was then stopped by addition of 50 mM EDTA at pH 8.0. Sections were photographed with a DS-Ri1 camera (Nikon México) mounted on an Optiphot-2 microscope (Nikon), and processed using NIS software (Nikon).

#### 2.10. Photosynthesis measurements

An IRGA LI-6400 TX apparatus (LiCor Biosciences, Lincoln, NE) with an internal radiation lamp set at 800 µmol quanta/m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, was employed to measure CO<sub>2</sub> fixation, which was similar to the natural radiation into the greenhouse. The IRGA probe employed contains an

internal area of 3 cm<sup>2</sup>, tree attached leaves bigger than this area were carefully located into the probe and photosynthesis rate was measured after one minute of isolating the leaf. Six different leaves were analyzed per plant and values were averaged. Also, measurements were carried out for younger fully expanded leaves. Since the measurement is not destructive, leaves continued attached to the citrus trees.

### 2.11. Quantification of CLAs in plant samples

Total DNA was obtained using DNeasy kit (Qiagen) using 100 mg of leaf mid-vein. Bacterial viability was quantified by Ethidium Monoazide-Treated DNA, followed by PCR (EMA-PCR), essentially as previously described (Trivedi et al., 2009). EMA enters to non-permeable dead cells and binds to DNA, it also binds to free DNA from lysed bacteria. In the presence of light, EMA covalently binds to DNA; which cannot be longer used by Taq polymerase as template; quantification of CLAs from EMA-PCR represents live bacteria. A parallel PCR assayed with DNA without EMA treatment detects total bacteria. The arithmetic subtraction of total PCR minus EMA-PCR represents dead bacteria. Considering EMA is light sensitive, aliquots were stored in dark microtubes and DNA treatment was always performed in the dark, while its inactivation was also carefully assayed checking light intensity. In this case, two samples were assayed by triplicate, one corresponding to the direct DNA extraction and the other to EMA-DNA extraction, to calculate the ratio of dead and live cells to the total number of cells. To determine the number of CLAs cells, a calibration curve was established using, as standard, a 700 bp 16S rRNA fragment from this bacterium. To this end, the recombinant-plasmid concentration was measured using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham MA) and standardized from  $2 \times 10^7$  to 200 copies per PCR reaction. Plasmid copy number was calculated based on the molecular weight using the following formula: Number of copies = (Amount in ng  $\times$  Avogadro's Number)/(Length in bp  $\times 1 \times 10^9 \times 650$ ), considering an average molecular weight of 650 Da for each nucleotide.

Real time PCR reactions contained 240 nM target primer HLBas/HLBr, 120 nM target probe HLBp, 240 nM target primer internal control primer Coxf/Coxr, 120 nM target internal control probe Cox, 1X PCR buffer, 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 240  $\mu$ M dNTPs and 1 unit Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). For qPCR, a RG-3000 Real Time PCR system; conditions for this amplification were 94 °C for 20 s followed by 40 cycles at 95 °C for 1 s and 58 °C for 40 s (Wang et al., 2016).

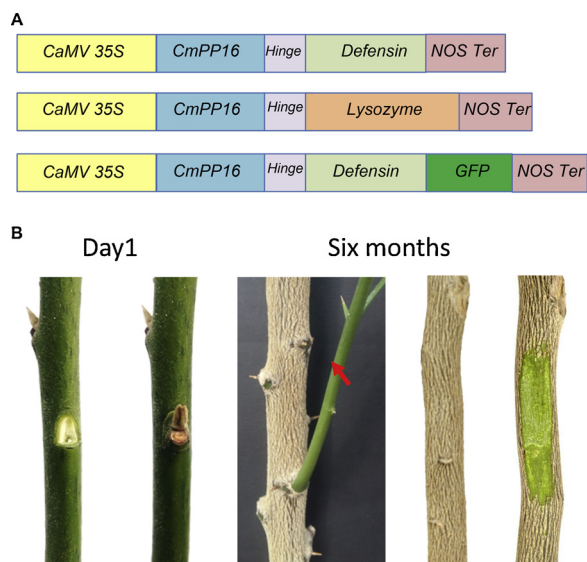
### 2.12. Statistical analysis

To assess significant differences between treatments with the various antimicrobials, analysis of variance (ANOVA) was employed to compare the means of pair groups (each treatment and control). When significant differences were observed in compared treatments and controls, Fisher's Least Significant Difference test (LSD) was then calculated to determine the higher limit allowed between each treatment mean, in order to consider whether they belong to the same population; then, the real difference was calculated between the population average, relative to the LSD. The non-parametric statistical test Kruskal-Wallis was also employed. The analysis of different populations are described in Supplementary Tables 1–5.

## 3. Results

### 3.1. CmPP16-Lysozyme and $\beta$ -defensin 2 fusion proteins move systemically in Mexican lime

To deliver antimicrobial peptides into the plant vascular system, both human lysozyme and  $\beta$ -defensin 2 sequences were translationally fused to the 3'-end of the CmPP16 open reading frame (ORF), to yield CmPP16-Lys and CmPP16-Def constructs. To enhance correct folding of both proteins, a flexible linker rich in glycine and alanine was added as



**Fig. 1.** Expression of antimicrobial proteins fused to CmPP16, a phloem-specific protein.

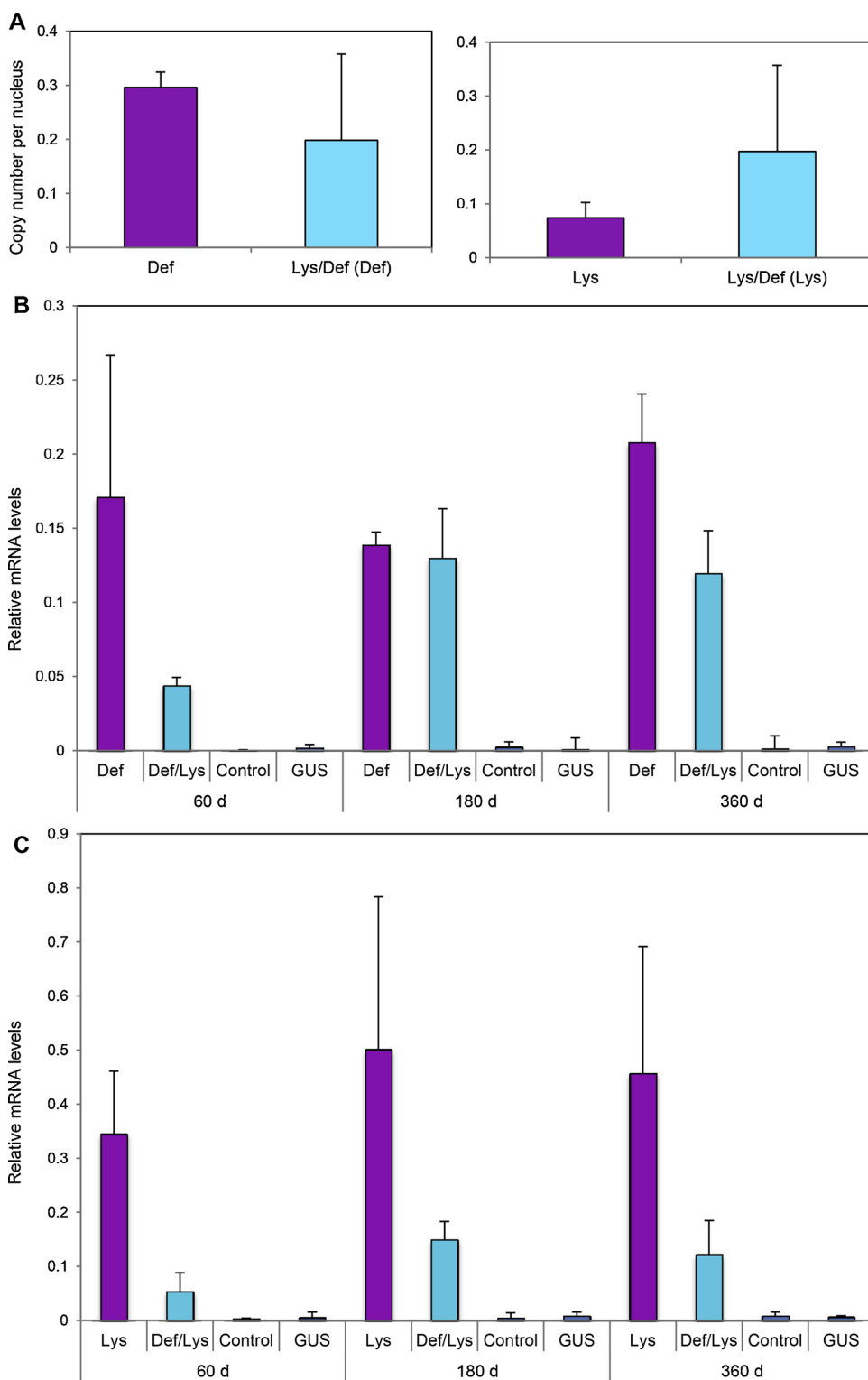
(A) Constructs were driven by the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter (CaMV 35S) and a NOS terminator (NOS Ter). The CmPP16 ORF was fused in-frame to a flexible linker, and the following antimicrobial peptides; human defensin, human lysozyme, or defensin-GFP. (B) *Citrus volkameriana* was used as rootstock naturally infected with HLB. An axillary bud was excised from the rootstock (left); Mexican lime scion was grafted onto this site (middle). After six months, once the scion was established, stems were observed (painted with the red arrow) its main stem was abraded to expose the underlying green tissue (right). Agrobacteria was then inoculated onto this tissue. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

a hinge between both ORFs (Wriggers et al., 2005) (Fig. 1A; Supplementary Fig. S1). Mexican lime bud scions were grafted onto CLAs-infected *C. volkameriana* (Fig. 1B) The lateral incision is observed on the left picture, where the bud with same dimension of *Citrus aurantifolia* was inserted. After six months of grafting, branches of *C. aurantifolia* appeared, showed in the central picture with the red arrow. Corked stems were transformed locally with *Agrobacterium tumefaciens*. Fig. 1B, right pictures. A blade was employed to expose the photosynthetic green tissue and incubated with *A. tumefaciens*, as described in M & M.

The genetic transformation was confirmed by PCR amplification of DNA extracted from leaves, excised from the inoculation site; ten independent lines were assayed. In some cases, the transgene was not detected likely due to the tissue being a genetic mosaic (Supplementary Fig. S2). Indeed, in the positive lines the transgenes were detected by qPCR at a proportion lower than nuclear DNA; this supports the notion that the analyzed leaves are genetic mosaics regarding the presence of the transgene (Fig. 2A).

In parallel, the transcript levels of CmPP16-Def and CmPP16-Lys were determined by qRT-PCR in young leaves that emerged after transformation. These transgenes were also detected in systemic leaves sampled 60, 180 and 360 days after transformation, indicating that they are expressed for extended periods (Fig. 2B). However, the levels for these transcripts were generally lower in the situation where both constructs were simultaneously agro-infiltrated (Fig. 2B).

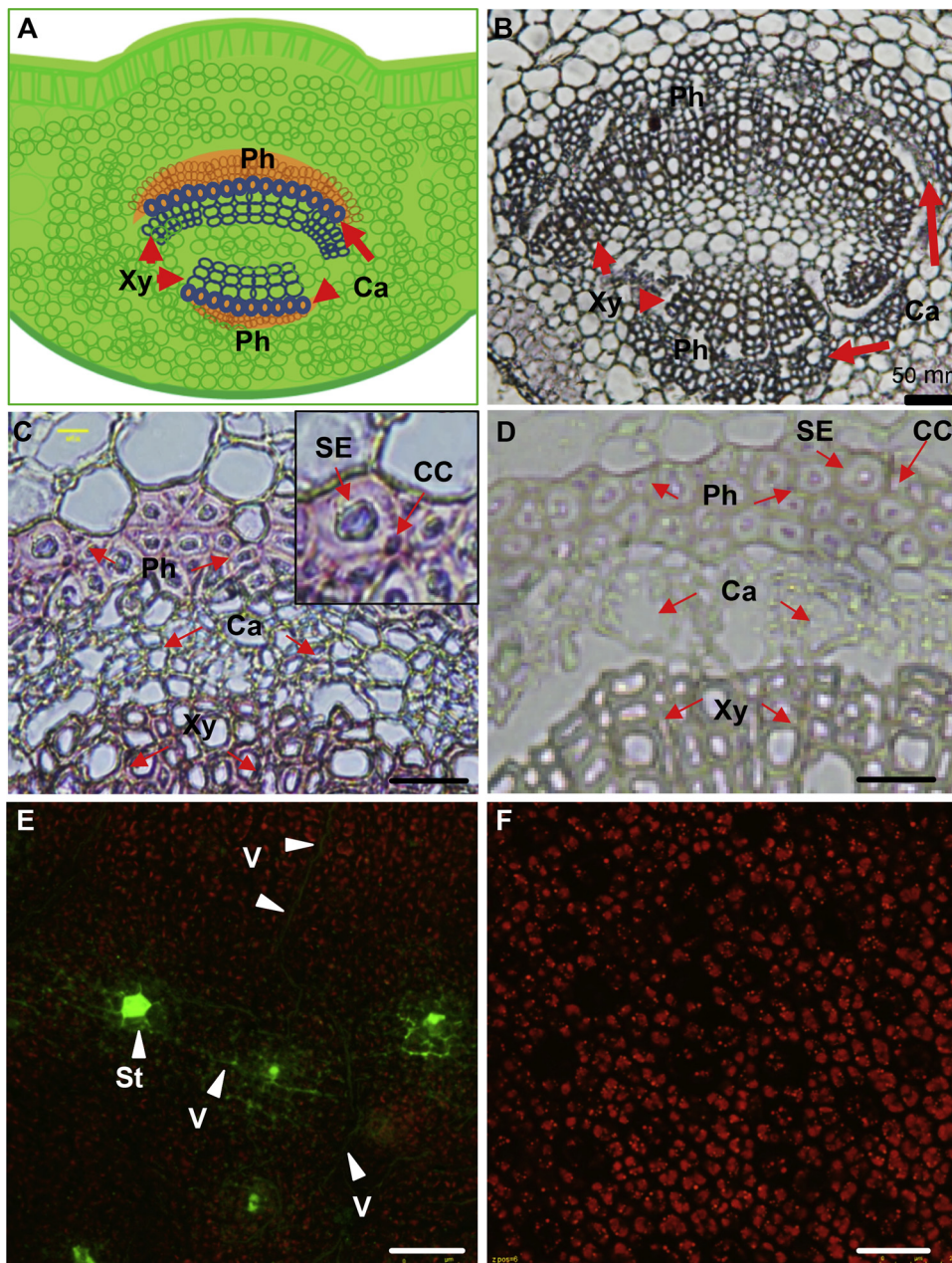
Immunolocalization of CmPP16-Def was also carried out to determine its tissue distribution in the midvein from leaves in which the mRNA had been already detected. A diagrammatic representation of a cross section of a leaf midrib and an untreated section are shown in Fig. 3A and B. Indol-color associated signal, corresponding to CmPP16-Def was detected in the CC-SE complex (Fig. 3C); in contrast, no signal was observed when the tissue was treated with preimmune serum (Fig. 3D). This indicated that CmPP16-Def, synthesized within the agro-



**Fig. 2.** Quantification of *CmPP16-Def* and *CmPP16-Lys* gene copy number and transcripts in transformed Mexican lime plants. **(A)** mRNA accumulation was determined in leaves closest to the inoculation site. DNaseI-treated total RNA was employed to determine mRNA abundance by quantitative real-time PCR and normalized against cytochrome oxidase (*COX*) mRNA as an endogenous control, using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). **(B)** *CmPP16-Def* transcript levels in leaves from young shoots at 60, 180 and 360 days after agro-infiltration. Control indicates untreated HLB-infected plants **(C)**. *CmPP16-Lys* transcript levels at 60, 180 and 360 days after agro-infiltration. Bars indicate standard deviation.

inoculation sites, was able to move systemically into new leaves; and, additionally, to accumulate in the functional phloem, which is the site where CLas accumulates. To further identify the tissues and cell types in which these fusion proteins accumulate, after sixty days of local genetic transformation, human defensin was detected using monoclonal antibodies. Detection of human lysozyme was not conclusive due to the background observed in control plants (data not shown). Additional Mexican lime plants were inoculated with constructs in which the *GFP* ORF was added to the 3'-end of the *CmPP16-Def* construct. Leaf blades

were agro-infiltrated and seven days later were analyzed by confocal laser microscopy. Here, signal was detected in minor veins (Fig. 3E, F). These assays confirmed the capacity of this *CmPP16-DEF-GFP* fusion protein to enter and accumulate in vascular tissue of adult Mexican lime plants, following agro-infiltration. Leaf blades locally expressing the fusion *CmPP16-Def-GFP* were not challenged to HLB infection.



**Fig. 3.** CmPP16-Defensin fusion protein accumulates in the vascular tissue in leaves, and localizes to minor veins of agro-infiltrated leaves.

(A) Diagram of transverse section of leaf midrib. Ph, Phloem; Xy, Xylem; Ca, Cambium (B). Transverse fresh section of midrib showing vascular tissue. (C) Immunolocalization of CmPP16-Def within the sclerenchyma and phloem. Red arrows indicates phloem cells, cambium and xylem. Inset in (C) shows a magnified Sieve Element (SE) and its Companion Cell, (CC) pointed with red arrows. (D) Control, midrib from wild-type Mexican lime; Red arrows indicates phloem cells, cambium and xylem. (E) and (F) Cellular localization of CmPP16-Defensin-GFP fusion protein in agro-infiltrated Mexican lime leaves. Tissue was analyzed three days after transformation. (E) Fluorescent mesophyll cells and minor veins. (F) Control, untransformed Citrus leaf. St, stomata; V, veins. Bars in (E) and (F) are 50  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3.2. Plants treated with antimicrobial fusion proteins displayed ameliorated symptoms

We next assessed whether the treatment affected disease symptom development. Inoculated and control plants were monitored for symptom development over a 360 day period. Mature leaves, already present before agro-infiltration of the various constructs, showed typical HLB blotchy mottle. HLB-associated symptoms started to develop on untreated control leaves by 60 days after agro-infiltration (Fig. 4A). By contrast, newly formed leaves from scions treated with *A. tumefaciens* harboring CmPP16-Def (Fig. 4B and C) or CmPP16-Lys (Fig. 4D) constructs showed little to no symptoms.

Similarly, leaves from scions treated with a mixture of the *A. tumefaciens* strains containing both constructs also exhibited only mild HLB-associated symptoms. Additionally, shoots were longer in plants treated with either or both constructs than in controls (see below). In general, all older leaves displayed blotchy mottle, but treated trees had young flush with no symptoms. Most infected trees show no symptoms

in young flush. These findings suggested that the fusion proteins are able to reach the phloem tissues, whereby they appear to reduce CLAs symptoms.

### 3.3. Plants treated with chimeric antimicrobial constructs showed reduced CLAs titers

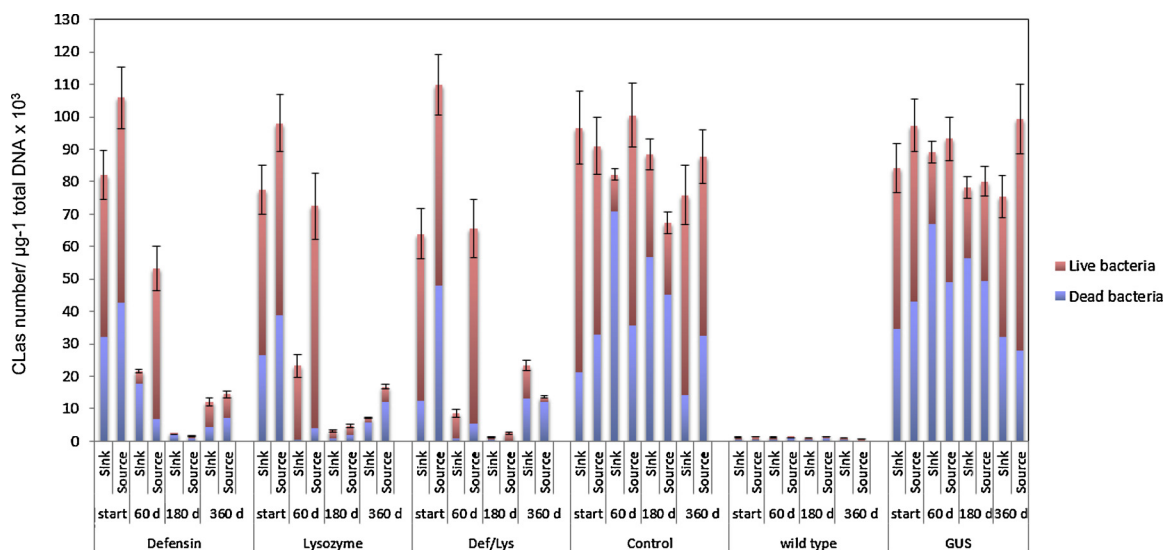
Pre-existing mature leaves and newly emerged leaves were collected and tissues were tested for the presence of CLAs; live or dead bacterial content was also estimated using EMA-PCR (Fig. 5). Considering DNA and RNA are stable molecules in the phloem stream (Xoconostle-Cázares et al., 1999; Ruiz-Medrano et al., 1999; Kim et al., 2014), to assess the effect of the antimicrobial proteins on CLAs viability, it was considered important to quantify whether CLAs DNA was detected from circulating CLAs DNA from dead bacteria or still live CLAs within the vascular tissue. To quantify the number of bacteria present, calibration curves were calculated (Supplementary Fig. S3). Bacteria content is represented as CLAs number  $\times 10^3$  per  $\mu$ g-1 total DNA (Fig. 5). Total



**Fig. 4.** Newly formed leaves from agro-infiltrated plants with *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys* and their mixture showed reduced symptoms relative to untreated HLB-infected control plants. (A) Untreated HLB-infected plant. (B) Plant agro-infiltrated with the *CmPP16-Def* construct. (C) Plant agro-infiltrated with *CmPP16-Lys* construct. (D) and (E) Plants treated with both *CmPP16-Def* and *CmPP16-Lys* constructs. Asterisks indicate leaves with no symptoms.

content is represented with the blue plus red bars, while live bacteria is showed with blue color; live bacteria is shown in red. The amount of live bacteria decreased in all treated plants, with the most notable effect being in sink leaves (Fig. 5). A decrease in CLas titer was observed in plants treated with *A. tumefaciens* harboring either antimicrobial or a combination of both, starting 60 days after infiltration. Indeed, plants expressing antimicrobials showed between 80–95% lower bacterial content in sink leaves than in the infected control plants or infected

expressing GUS. To identify statistically significant differences in bacterial content between untreated controls (healthy and HLB-infected), as well as in plants agro-infiltrated with constructs expressing the antimicrobials, ANOVA one-way test, followed by LSD analysis and the non-parametric Kruskal-Wallis test were performed. Significant differences were identified from 60 days of antimicrobial expression when dead bacteria was compared. To note is the CLas decrease in sink tissue, consistent with the movement of phloem sap from source to sink



**Fig. 5.** CLas content in treated and untreated Mexican lime scions.

Las genome equivalents were obtained by qPCR from scions expressing *CmPP16-Def* (Def), *CmPP16-Lys* (Lys), the mixture (Def/Lys), and untreated plants (HLB-infected control and GUS), as well as healthy plants. CLas content was determined in source leaves of plants at the start of treatment, 60, 180 and 360 days after agro-infiltration. Upper portion of bars with red color indicate dead bacteria, while lower portions with blue color, indicate live bacteria. Bars indicate standard deviation for total CLas population. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

tissues, were in general, the CLAs decrease was not as marked in source leaves. The comparison of live bacteria among the treatments and control untreated plants shows no difference at the starting and 60 days after the expression of antimicrobials. Significant differences were observed from 180 to 360 days. (Statistic calculation are presented in Supplementary Tables 1–4). Healthy control plants were also tested, in which no CLAs was undetectable, in agreement with the absence of insect vector in the greenhouse conditions. These findings are consistent with the notion that the fusion proteins, and/or their transcript, have the capacity to move systemically to distant tissues. We also observed that bacterial content fluctuated, during the 360-day experimental period; indeed, after this period, a decrease in CLAs was also observed in control plants. This finding is consistent with a recent report (López-Buenfil et al., 2017), in which seasonal fluctuation were registered.

### 3.4. Plants locally expressing antimicrobial fusion proteins display favorable traits relative to infected untreated controls

We next assessed whether the lower CLAs titer was associated with an improved physiological status of the agro-inoculated plants. To this end, photosynthetic capacity was measured as carbon fixation ( $\text{mmol CO}_2/\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ), at the treatment onset, and subsequently 60, 180 and 360 days later. Interestingly, expression of *CmPP16-Def* or *CmPP16-Lys*, or the combined treatment, resulted in the maintenance of photosynthetic capacity equivalent to healthy control plants, whereas the HLB-infected plants displayed a decrease (Fig. 6). Statistic differences were identified by analyzing the photosynthesis capacity with one-way ANOVA followed by LSD test, as well as with Krustal-Wallis test (Supplementary Tables 4 and 5). The comparison of  $\text{CO}_2$  fixation among the treatments and control untreated plants shows no difference at the starting and 60 days after the expression of the antimicrobials.

Significant differences were observed from 180 to 360 days.

It was also noticed that, as a rule, treated plants displayed more and longer shoots than untreated plants. As a proxy of total foliar area, the product of shoot length and shoot number, for each treatment, was determined 360 days after the onset of the experiment. This parameter was noticeably larger in treated versus untreated plants (Supplementary Fig. S4), indicating that plants treated with the antimicrobial fusion proteins were more vigorous than untreated plants. Assayed was considered to have provided conclusive results when at 360 days, control and GUS-expressing plants had shown defoliated branches, and their leaves were fully symptomatic.

## 4. Discussion

In addition to systemic viruses, several microbial pathogens are able to access the phloem translocation stream of their plants hosts, such as phytoplasmas and CLAs. The presence of the bacterial pathogen in the phloem presents a challenge, since externally applied chemical control agents (such as antibiotics) do not generally gain access to this tissue. Thus, we devised a strategy to target antimicrobial peptides to the phloem by translationally fusing them to a phloem-resident protein, CmPP16 (Xoconostle-Cázares et al., 1999). While plants harbor several defensin and thionin genes with significant antimicrobial activity, these are not present in the phloem translocation stream, or at least not reported in extant phloem proteome databases from several species, and would thus require targeted expression in the phloem (Gialvalisco et al., 2006; Lin et al., 2009; Rodriguez-Medina et al., 2011).

Expression of defensins under the control of CC-specific promoters, such as *SUC2*, has promise in treating pathogens able to colonize the phloem, but fusion to a SE-targeted protein, such as CmPP16, may enhance accumulation of the antimicrobial protein in this cell type, where CLAs ultimately resides. In order to avoid potential allergenic

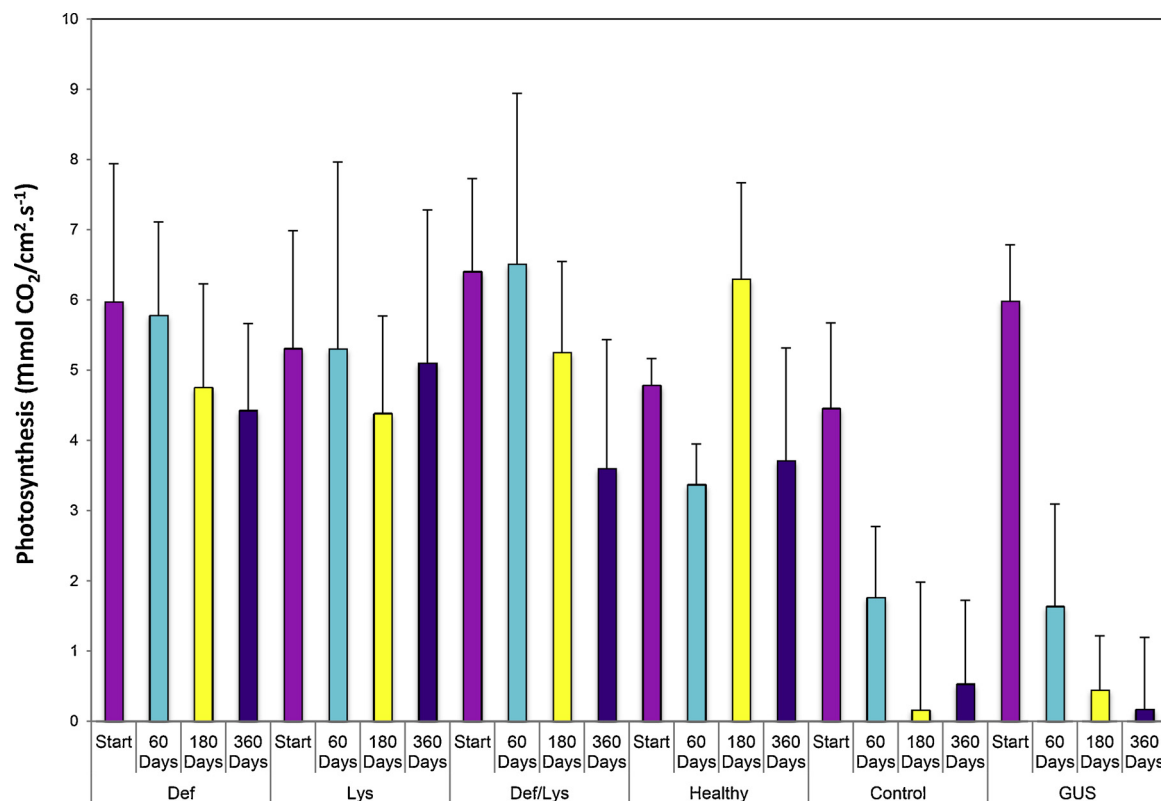


Fig. 6. Photosynthetic capacities in HLB-infected control plants expressing *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys*, and the mixture.

Photosynthetic rates were measured on mature leaves of HLB-infected Mexican lime plants expressing *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys*, *CmPP16-Def* and *CmPP16-Lys*, *GUS*, and HLB-infected Mexican lime trees agro-infiltrated with *A. tumefaciens* only (control). Healthy Mexican lime plants served as an additional control (Healthy). Measurements were carried out at the start, 60, 180 and 360 days after agro-infiltration.



reactions to foreign proteins in human consumers,  $\beta$ -defensin 2 and lysozyme of human origin were selected, both play an important role in innate immunity, and are largely expressed in epithelial tissues; indeed, it has been proposed its clinical use for controlling bacterial multi-resistance (Dong et al., 2016; Pachón-Ibáñez et al., 2017). Both antimicrobial proteins are expressed in the human body, and biosafety issues have been studied thoroughly (Brundige et al., 2008; Wang et al., 2016).  $\beta$ -defensin 2 forms pores in the membrane of target organisms, mainly eubacteria and fungi; it has been shown to confer resistance to different fungi when expressed in *Arabidopsis* (Aerts et al., 2007). Lysozyme hydrolyzes peptidoglycan in gram-positive bacteria, and under high hydrostatic pressure (a condition present in the plant sieve tube system) gram-negative bacteria also display susceptibility (Masschalck et al., 2001).

CmPP16 is a protein that accumulates in the mature functional phloem and may be involved in the response to stress, given that its homologs in rice and other plant species are induced by fungal elicitors, and their transient expression can provide drought tolerance (Ramírez-Ortega et al., 2014). Furthermore, the homologues of this protein are present in proteomic databases of edible fruits, such as pumpkin, cucumber, and *Citrus sinensis* (Ruiz-Medrano and Xoconostle-Cázares, unpublished results), suggesting that it is likely not toxic to humans.

As an speculation, the unexpected effects on shoot length and number observed in treated plants suggests that these proteins, despite of its human origin, may have additional functions in plants, at least in the case of defensin. Indeed, this is supported by the role of defensin in early flower and embryo development, as well as in pollen tube guidance (Balandín et al., 2005; Okuda et al., 2009; Stotz et al., 2009).

In the present study, a substantial decrease in CLas titer was observed in Mexican lime treated with either lysozyme or defensin fused to CmPP16, or the mixture of both, which was more marked 180 days after the start of the experiment. At 360 days the CLas titer increased somewhat, which could reflect decreasing amounts of synthesized antimicrobials, and/or the fluctuations observed in bacterial concentration in HLB-infected plants (López-Buenfil et al., 2017).

Older mature leaves remained symptomatic, due to the accumulation of starch, which seems not to be metabolized by the plant cells despite of the lower bacterial content. By contrast, new fully expanded leaves from plants treated with the different antimicrobial fusion proteins showed markedly reduced symptoms. Moreover, these leaves harbored the lowest levels of CLas of all treated plants examined. This finding supports the hypothesis that the antimicrobial protein (or its RNA) can move long-distance into young leaves. Detection of fusion protein in vascular bundles, and, in particular, in the phloem, provides further support for this hypothesis. Interestingly, the CmPP16-defensin-GFP fusion (as determined by GFP-associated fluorescence, Fig. 3) accumulated in only a few cell types; one might have expected this fusion protein to accumulate in most cell types in inoculated leaves, given that its expression was driven by the constitutive CaMV 35S promoter. However, as CmPP16 is a non-cell-autonomous protein (NCAP), it can traffic cell to cell and appears to move preferentially to certain cell types, a situation shown also for AtTCTP2, an *Arabidopsis* NCAP (Toscano-Morales et al., 2015).

The enhanced photosynthetic performance of plants that underwent an antimicrobial treatment may be attributed to an improvement of the general physiological status achieved two months after the inoculation.

Our findings indicate that the local expression of antimicrobial peptides fused to proteins present in the SE is sufficient for systemic delivery of the fusion transcript and/or protein to infected tissue. Another interesting point is that the tissue that was initially agro-inoculated maintained production of the fusion transcript and its protein for many months. Thus, this strategy could be used to inoculate rootstocks to protect non-GM scions and non-GM fruits. It could also be used to target proteins of interest to the plant vascular tissue, and to tree species, in particular those prone to disease. Finally, defensins have been expressed in different plant species, and shown to confer

resistance to bacteria and fungi (Stotz et al., 2009). Citrus plants expressing a modified thionin, a protein related to animal defensins, show resistance not only to CLas, but also to *Xanthomonas citri*, the causal agent of citrus canker (Hao et al., 2016). Thus, defensin with dual localization in phloem and xylem could also be used to protect plants afflicted with similar diseases. It is important to mention that the results obtained in this study were obtained under greenhouse conditions, in which plants were not being re-inoculated by vectors harboring CLas. Thus, it will be of interest to determine the behavior of plants expressing antimicrobials in open field trials where HLB is prevalent.

#### Author contributions

B.X.-C. and R.R.-M. planned the experimental strategy, designed the constructs and wrote and revised the manuscript; M.A.G.-L. carried out the agro-infiltration experiments, qPCR and qRT-PCR, and confocal microscopy analyses; F.A.R.-O. carried out agro-infiltration experiments, and performed the statistical analysis; E.L.-K. carried out grafting experiments, and coordinated plant maintenance; J.J.H.M. assisted with agro-infiltration experiments; F.A.R.-O., C.C.-P., O.M.-G. and J.A.L.-B. carried out the statistical analysis and contributed to revising the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

#### Disclosure of potential conflict of interest

The strategy to fuse proteins of interest to sieve-element specific proteins is part of the patent filed on behalf of CINVESTAV-IPN.

#### Acknowledgments

This work was supported by SENASICA grants to B.X.-C. and R.R.-M. M.A.G.-L. and F.A.R.-O. were supported by doctoral fellowship from CONACyT. J.A.R.-P. received M.Sc. fellowship support from CONACyT. We are grateful to our anonymous reviewers for their constructive suggestions. We thank Rebeca Zecua-Nájera and Andrea Gómez-Felipe for technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.012>.

#### References

- Aerts, A.M., Thevissen, K., Bresseleers, S.M., Sels, J., Wouters, P., Cammue, B.P., François, I.E., 2007. *Arabidopsis thaliana* plants expressing human beta-defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. *Plant Cell Rep.* 26 (8), 1391–1398.
- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., Sakakibara, H., 2005. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell* 17 (6), 1801–1814.
- Balandín, M., Royo, J., Gómez, E., Muniz, L.M., Molina, A., Hueros, G., 2005. A protective role for the embryo-surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol. Biol.* 58 (2), 269–282.
- Bové, J.M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88 (1), 7–37.
- Brundige, D.R., Maga, E.A., Klasing, K.C., Murray, J.D., 2008. Lysozyme in transgenic goats' milk influences gastrointestinal morphology in young pigs. *J. Nutr.* 138 (5), 921–926.
- Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., Rodríguez-García, M., López, Y., Aranguren, M., Alonso, E., Delgado, R., Luis, M., Batista, L., Paredes, C., Rodríguez, M., Pujol, M., Ochagavía, E., Falcón, V., Terauchi, R., Matsumura, H., Ayra-Pardo, C., Llauger, R., Pérez, M.C., Núñez, M., Borrusch, M.S., Walton, J.D., Silva, Y., Pimentel, E., Borroto, C., Borrás-Hidalgo, O., 2016. 'Candidatus Liberibacter asiaticus', causal agent of citrus huanglongbing is reduced by treatment with brassinosteroids. *PLoS One* 5 (11), e0146223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146223>.
- da Graça, J.V., Douhan, G.W., Halbert, S.E., Keremane, M.L., Lee, R.F., Vidalakis, G., Zhao, H., 2016. Huanglongbing: an overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *J. Integr. Plant Biol.* 58 (4), 373–387. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>.

- Ding, F., Duan, Y., Paul, C., Brlansky, R.H., Hartung, J.S., 2015. Localization and distribution of 'Candidatus liberibacter asiaticus' in citrus and periwinkle by direct tissue blot immuno assay with an Anti-OmpA polyclonal antibody. *PLoS One* 10 (5), e0123939.
- Dong, H., Lv, Y., Zhao, D., Barrow, P., Zhou, X., 2016. Defensins: the sase for their use against mycobacterial infections. *J. Immunol. Res.* 2016, 7515687.
- Dutt, M., Barthe, G., Irely, M., Grosser, J., 2015. Transgenic citrus expressing an arabisopsis npr1 gene exhibit enhanced resistance against huanglongbing (HLB; citrus greening). *PLoS One* 11 (1), e0147657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>.
- Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A., Kehr, J., 2006. Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* 6 (3), 896–909. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500155>.
- Ham, B.K., Lucas, W.J., 2017. Phloem-mobile RNAs as systemic signaling agents. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 173–195.
- Hao, G., Boyle, M., Zhou, L., Duan, Y., 2013. The intracellular citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' encodes two novel autotransporters. *PLoS One* 8 (7) e68921.
- Hao, G., Stover, E., Gupta, G., 2016. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and huanglongbing (HLB). *Front. Plant Sci.* 7, 1078. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01078>.
- Hu, J., Jiang, J., Wang, N., 2018. Control of citrus huanglongbing (HLB) via trunk injection of plant activators and antibiotics. *Phytopathology* 108 (2), 186–195.
- Johnson, E.G., Wu, J., Bright, D.B., Graham, J.H., 2014. Association of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol.* 63 (2), 290–298. <https://doi.org/10.1111/ppa.12109>.
- Kim, G., LeBlanc, M.L., Wafula, E.K., dePamphilis, C.W., Westwood, J.H., 2014. Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science* 345 (6198), 808–811.
- Koh, E.J., Zhou, L., Williams, D.S., 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 (3), 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0312-3>.
- Li, W., Levy, L., Hartung, J.S., 2009. Quantitative distribution of 'Candidatus liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99 (2), 139–144.
- Li, J., Trivedi, P., Wang, N., 2016. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus huanglongbing. *Phytopathology* 106 (1), 37–46. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0196-R>.
- Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S., Lucas, W.J., 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol. Cell Proteomics* 8, 343–356. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800420-MCP200>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- López-Buenfil, J.A., Ramírez-Pool, J.A., Ruiz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, M.C., Chavarín-Palacio, C., Moya-Hinojosa, J.J., Trujillo-Arriaga, F.J., Lira-Carmona, R., Xoconostle-Cázares, B., 2017. Dynamics of huanglongbing-associated bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus aurantifolia* Swingle (Mexican lime). *Pak. J. Biol. Sci.* 20 (3), 113–123. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.113.123>.
- Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.R., Helariutta, Y., He, X.Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S.M., Patrick, J.W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A.F., Grusak, M.A., Kachroo, P., 2013. The plant vascular system: evolution, development and functions. *J. Integr. Plant Biol.* 55 (4), 294–388. <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E.G., Michiels, C.W., 2001. Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), 339–344.
- Mirkov, T.E., Gonzalez-Ramos J., 2012. Pathogen resistant citrus compositions, organisms, systems, and methods. US Patent US20130205443A1.
- Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A., Kanaoka, M.M., Dresselhaus, T., Sasaki, N., Higashiyama, T., 2009. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458 (7236), 357–361. <https://doi.org/10.1038/nature07882>.
- Pachón-Ibáñez, M.E., Smani, Y., Pachón, J., Sánchez-Céspedes, J., 2017. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Rev.* 41 (3), 323–342.
- Patel, S., Akhtar, N., 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): the quintessential 'offense and defense' molecules are more than antimicrobials. *Biomed. Pharmacother.* 95, 1276–1283.
- Prasad, S., Xu, J., Zhang, Y., Wang, N., 2016. SEC-translocon dependent extracytoplasmic proteins of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Front. Microbiol.* 7, 1989.
- Ramírez-Ortega, F.A., Herrera-Pola, P.S., Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., 2014. Overexpression of the pumpkin (*Cucurbita maxima*) 16 kDa phloem protein CmPP16 increases tolerance to water deficit. *Plant Signal. Behav.* 9 (11), e973823. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.973823>.
- Rodríguez-Medina, C., Atkins, C.A., Mann, A.J., Jordan, M.E., Smith, P.M., 2011. Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.). *BMC Plant Biol.* 11 (36). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-36>.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J., 1999. Phloem long-distance transport of CmNACP-1 mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126 (20), 4405–4419.
- Stotz, H.U., Spence, B., Wang, Y., 2009. A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Mol. Biol.* 71 (1–2), 131–143.
- Toscano-Morales, R., Cabrera-Ponce, J.L., Xoconostle-Cázares, B., Hinojosa-Moya, J., Galván-Gordillo, V., Guevara-González, R.G., Ruiz-Medrano, R., 2015. AtTCTP2, an Arabidopsis thaliana homolog of translationally controlled tumor protein, enhances in vitro plant regeneration. *Front. Plant Sci.* 6, 468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00468>.
- Trivedi, P., Sagaram, U.S., Kim, J.-S., Brlansky, R.H., Rogers, M.E., Stelinski, L.L., Oswalt, C., Wang, N., 2009. Quantification of viable 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide. *Eur. J. Plant Pathol.* 124 (4), 553–563.
- Wang, H., Wu, H., Wang, K., Cao, Z., Yu, K., Lian, L., Lian, Z., 2016. Expression of recombinant human lysozyme in transgenic chicken promotes the growth of *Bifidobacterium* in the intestine and improves postnatal growth of chicken. *AMB Express* 6 (1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0280-2>.
- Wang, N., Pierson, E.A., Setubal, J.C., Xu, J., Levy, J.G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L.T., Martins Jr., J., 2017. The *candidatus liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55 (1), 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035513>.
- Wriggers, W., Chakravarty, S., Jennings, P.A., 2005. Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Biopolymers* 80 (6), 736–746.
- Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., Lucas, W.J., 1999. Plant paralogs to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283 (5398), 94–98.
- Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Lucas, W.J., 2000. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J.* 24 (6), 735–747.
- Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A.C., Ruiz-Medrano, R., 2016. Phloem long-distance trafficking of RNAs and proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021260.pub2>.



## Localized expression of antimicrobial proteins mitigates huanglongbing symptoms in Mexican lime



Miguel-Angel Guerra-Lupián<sup>a</sup>, Roberto Ruiz-Medrano<sup>a</sup>, José-Abrahán Ramírez-Pool<sup>a</sup>, Francisco-Arturo Ramírez-Ortega<sup>a</sup>, José-Abel López-Buenfil<sup>a,b</sup>, Emiliano Loeza-Kuk<sup>c</sup>, Oscar Morales-Galván<sup>b,1</sup>, Claudio Chavarin-Palacio<sup>b</sup>, Jesús Hinojosa-Moya<sup>d</sup>, Beatriz Xoconostle-Cázares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Zacatenco, 07360, CDMX, Mexico

<sup>b</sup> Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria, Carretera Federal Pachuca-México Km 37.5, Centro, 55740, Tecámac de Felipe Villanueva, Estado de México, Mexico

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Campo Experimental Mocochoá, Carretera Mérida-Motul km 25, Mocochoá, Yucatán, C.P. 97454, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Antimicrobial proteins  
*Candidatus Liberibacter asiaticus*  
 Citrus greening disease  
 Huanglongbing  
 Mexican lime  
 Phloem biology

### ABSTRACT

Citrus huanglongbing (HLB) is a devastating disease associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus* spp. (CLas), a bacterium restricted to the sieve tube system of the phloem that is transmitted by the psyllid vector, *Diaphorina citri*. In this study, the human antimicrobial peptides, lysozyme and  $\beta$ -defensin 2, were targeted to the vascular tissue of Mexican lime (*Citrus x aurantifolia* [Christm.] Swingle) by fusion to a phloem-restricted protein. Localized expression was achieved, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the stem, which led to protein expression and mobilization within the vascular tissue of heterotrophic tissues. HLB-infected plants were monitored for 360 days. Lower bacteria titers were observed in plants expressing either  $\beta$ -defensin 2, lysozyme, or the combination thereof, and these plants had increased photosynthesis, compared to untreated control trees. Thus, targeting of antimicrobial proteins to the vascular tissue was effective in decreasing CLas titer, and alleviating citrus greening symptoms. Based on these findings, this strategy could be used to effectively treat plants that are already infected with bacterial pathogens that reside in the phloem translocation stream.

### 1. Introduction

Huanglongbing (HLB; yellow dragon disease in Chinese) is a devastating citrus disease with a worldwide distribution, especially in citrus-producing countries, such as Brazil, USA, China and Mexico, among others. This disease is quite destructive, causing severe loss in production, since commercial cultivars are highly susceptible. The symptoms associated to HLB are asymmetric yellowing of leaves blotchy mottle, decrease in tree productivity, asymmetric colored fruits, aborted seeds and, eventually, tree death. This disease has spread rapidly in both tropical and subtropical regions in the world and is currently considered the main threat to the citrus industry (Bové, 2006; da

Graça et al., 2016).

HLB is associated to the bacterium *Candidatus Liberibacter* (ca. L.), of which there are three species: ca. L. *asiaticus* (CLas), ca. L. *americanus* (CLam) and ca. L. *africanus* (CLaf) and CLas and CLam are transmitted by the psyllid insect *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), while CLaf is transmitted by the triozid *Trioza erytrae*. This vector feeds from early larval stages on young citrus shoots, where it is often not exposed to applied pesticides. Thus, vector control, while otherwise deemed a viable strategy, has not been effective. Once HLB is transmitted and infection established, bacteria are restricted to the vascular tissue, particularly in mature phloem, i.e., within the companion cells (CC) and sieve elements (SE), which form CC-SE complexes, and are more

\* Corresponding author.

E-mail address: [bxoconos@cinvestav.mx](mailto:bxoconos@cinvestav.mx) (B. Xoconostle-Cázares).

<sup>1</sup> Present address: Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, C.P. 35230.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.012>

Received 8 January 2018; Received in revised form 16 July 2018; Accepted 24 August 2018

Available online 05 September 2018

0168-1656/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

concentrated in source, photosynthetically active tissues (Li et al., 2009; Ding et al., 2015)

CLas infects members of the Rutaceae family, and the close species ca. *L. psyllaurosus* has been detected in Solanaceous plants, whereas a phytoplasma has been also associated to ca. *L.* in Brazil and China, being both phloem-restricted pathogens. Phylogenetic analysis of ca. *L.* based on its genome shows that it belongs to the Rhizobacteria clade, which are all Gram-negative bacteria with cell wall-containing peptidoglycan; a finding confirmed by ultrastructural analysis, congruent with a Gram-negative cell wall organization (Bové, 2006). Thus, CLas is potentially susceptible to cell-wall hydrolases, such as lysozyme.

The accumulation of CLas in the CC-SE complex causes a substantial accumulation of callose ( $\beta$ -1,3 glucans) in mature, functional sieve tubes, thereby blocking both plasmodesmata (PD) interconnecting CC-SE complexes and sieve plate pores (SPP), resulting in a disruption to normal photosynthate translocation from source to sink tissues (Bové, 2006; Koh et al., 2012; Johnson et al., 2014). Additionally, CLas likely secretes virulence factors that may also affect phloem function (Hao et al., 2013; Prasad et al., 2016; Wang et al., 2017).

A range of strategies have been employed to control CLas infection, including the use of antibiotics, such as tetracycline (Bové, 2006). An additional problem is that, since CLas resides in the phloem, externally applied products are mostly excluded from this vascular tissue, although stem injection, inducers of defense response and antibiotics may, to some degree, circumvent this limitation (Hu et al., 2018). In any event, more sustainable strategies are needed to control HLB. For example, the central regulator of plant immunity from *Arabidopsis*, NPR1, has been overexpressed in citrus plants to successfully control HLB (Dutt et al., 2015). Similarly, external application of defense-response inducers has shown promise in decreasing CLas titer in field trials (Li et al., 2016). Interestingly, Canales et al. (2016) applied epibrassinolide to HLB-infected citrus plants under both greenhouse and field conditions, registering a reduction of the CLas titers. The antimicrobial lysozyme (1,4- $\beta$ -N-acetylmuramidase C) contains 148 amino acids and belongs to the family of glycosyl hydrolases. Its function is bacteriolytic, it carries out the hydrolysis of  $\beta$ 1,4- bonds between the N-acetylmuramic (NAM) and N-acetyl-D-glucosamine (NAG) residues of the peptidoglycan present in the bacterial cell wall (Uniprot Data base, 2018).  $\beta$ -Defensins have broad-spectrum activity against bacteria creating voltage-dependent channels in bacterial membranes that allow the influx of water. The presence of six cysteines and three intramolecular disulfide bridges present in the amphipathic molecule interacts with bacterial membranes, destabilizing it by creating pores. Increased osmotic pressure ruptures the bacterial membranes.  $\beta$ -defensins can also block cell wall biosynthesis by binding to lipid II, the peptidoglycan building block (Patel and Akhtar, 2017). Defensins from spinach displaying a low oral toxicity expressed in Citrus plants, showed promising results (Mirkov, Gonzalez-Ramos, 2012). Plant thionin has also provided mitigation of HLB symptoms (Hao et al., 2016).

Another strategy is the expression of antimicrobial peptides in the vascular tissue, more specifically in the CC-SE complex. The vascular tissue is comprised of xylem, which conducts water and mineral nutrients from root to shoots, and the phloem, which translocates photoassimilates, minerals, proteins and nucleic acids, from source to sink tissues (Lucas et al., 2013; Xoconostle-Cázares et al., 2016). The CC-SE complex is interconnected via specialized branched PD, and specific proteins, synthesized in the CC, are transported through these PD into the enucleate SE. One such protein, CmPP16 from pumpkin (*Cucurbita maxima*), is thought to play a role in response to stress (Xoconostle-Cázares et al., 1999; Ramírez-Ortega et al., 2014). This phloem protein could serve as a vehicle to target candidate fusion proteins for delivery into the sieve tube system. This protein has been tested by its capacity to facilitate the translocation of both plant and viral RNA and proteins in mesophyll cells, as well as in the boundary CC-SE, to reach long distant tissues through the phloem stream (Xoconostle-Cázares et al.,

1999, 2000; Aoki et al., 2005). The supracellular movement of proteins and RNAs may act as gene regulatory networks involved in plant growth, defense, and crop yield at the whole-plant level (Ham and Lucas, 2017).

Although in planta expression of proteins with antimicrobial activity has great potential to control CLas, the challenge is to provide access of such proteins to the highly selective phloem domain of the sieve tube system. In order to overcome this limitation, two antimicrobial proteins, human lysozyme and human  $\beta$ -defensin 2 were translationally fused to CmPP16 and transiently expressed in Mexican lime (*Citrus x aurantifolia* [Christm.] Swingle). The results presented here demonstrate that plants expressing both fusion proteins exhibited a significant decrease in CLas titer, amelioration of symptoms and photosynthetic activity similar to healthy control plants. Therefore, this strategy could be used to control diseases caused by pathogens that reside exclusively in the vascular tissue.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

One-year-old HLB-symptomatic Mexican lime plants were naturally infected in Mochochá, Yucatán State, Mexico; citrus greening entered to Mexico in Yucatán State in 2013 (SENASICA, 2018). CLas was quantified in these plants, while Citrus Tristeza Virus (CTV) was not detected in the young trees using molecular detection methods (data not shown). Buds from the infected Mexican Limes were then grafted onto *Citrus volkameriana* root stocks, and grown in pots in a greenhouse at the Mochochá Experimental Station, INIFAP, Mochochá, Yucatán, México. Grafted plants were allowed to grow and CLas content was determined in order to confirm that these were infected with CLas. Nine-month-old plants, with an approximate height of one meter, with clear HLB symptoms were then subjected to localized genetic transformation and expression analysis. In parallel grafting assays, healthy buds from certified Mexican lime were also obtained, and employed as isogenic controls.

### 2.2. Plasmid construction

*Agrobacterium tumefaciens* binary vector was designed to contain an expression cassette harboring the DNA sequences for human  $\beta$ -defensin 4 A precursor ( $\beta$ -defensin 2; Genbank accession No. NP\_004933.1) or the processed form of human lysozyme C chain A (Genbank accession No. AAA59535.1), with citrus-optimized codon usage and translationally fused to the pumpkin CmPP16 open reading frame (ORF) (Genbank accession No. AAD05496.1) to yield CmPP16-Def and CmPP-Lys, respectively. The ORF is driven by the CaMV 35S constitutive promoter and the T-Nos terminator. The complete expression unit was flanked by the Left and Right borders (LB, RB) from *A. tumefaciens* T-DNA. The synthetic construct was assembled by Genscript Corp. (Piscataway, NJ) and cloned into the pUC57 vector, which harbors the ampicillin resistance gene. As a control, it was employed *A. tumefaciens* harboring the pMON3804 vector (kindly provided by Dr. Carmen Quinto, Instituto de Biología UNAM, Cuernavaca, México), which contains the *uidA* gene (GUS) driven by the CaMV 35S promoter.

The binary plasmids were introduced by electroporation into *A. tumefaciens* C58C1, using an Equibio electroporator and 1 mm cuvettes (Equibio, Middlesex, UK) which was then cultured at 28 °C for 48 h in LB medium containing 100 mg/l carbenicillin. Bacterial cells were pelleted at 5000  $\times$  g for 10 min and resuspended in the same volume of inoculation medium (IM), consisting of MS salts, 2% sucrose, 20  $\mu$ M Indolacetic Acid, 0.2% Silwett 40 and 140  $\mu$ M Acetosyringone.

### 2.3. Experimental design

Fifteen plants with HLB symptoms were used for each of the

following treatments: lysozyme, defensin, lysozyme plus defensin, a *GFP-uidA* fusion as a marker gene and mock inoculation, in addition 15 healthy isogenic plants were also employed. At least four branches were assayed for transient expression in each plant, and three leaves from each plant. Fully expanded (source) and young (sink) leaves were pooled and analyzed in triplicate for transcript analysis, photosynthesis measurements and CLas quantification.

#### 2.4. Localized genetic transformation

Grafted, HLB-symptomatic plants were selected for localized expression. Mexican lime grafted onto CLas-infected *C. volkameriana* rootstocks were agro-infiltrated as follows. An area of 2–5 cm<sup>2</sup> on the plant stem was scraped with a sterile blade to remove the dead bark tissue to expose the underlying green living tissue. A cotton swab soaked in inoculation medium containing the recombinant *A. tumefaciens* was then applied to the exposed surface; the cotton was immobilized with plastic wrap and the entire plant was covered with a large clear plastic bag for 48 h to maintain high humidity and favor the genetic transformation and emergence of newly transformed tissue. After incubation, the cotton swab was removed and plants were irrigated only with water to avoid masking HLB symptoms. Plants were then analyzed; biopsies of local and distant tissues were assessed for the presence of both the DNA construct and defensin and lysozyme encoding transcripts.

For plants in which GFP-associated fluorescence was monitored, healthy Mexican lime plants 60 cm in height were used for transformation with *A. tumefaciens* C58C1, harboring a *CmPP16-Defensin-GFP* fusion, essentially as previously described.

#### 2.5. Transgene detection by PCR

Genomic DNA obtained from 100 mg of mature and young leaves from control and agro-infiltrated Mexican lime was used as template to determine the presence of the transgene, using the DNeasy extraction Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) by end point PCR with the following primers: DEF forward 5'-ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTC AGC-3', DEF reverse 5'-CTACTTCTTCTTGACGATCTGTACC-3', to amplify a 180 bp fragment, corresponding to the human  $\beta$ -defensin gene fragment; LYS forward 5'-AGGTTTTCGAAAGATGCGAACTTGCTA GAA-3', LYS reverse 5'-AAACACCGCAACCTTGAACATATTGTCTGC-3', to amplify a 400 bp fragment corresponding to the human lysozyme gene fragment. The reactions were performed on a T-1000 thermal cycler (Göttingen, Germany), under the following conditions: 3 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 35 s at 94 °C; 35 s at 58 °C and 30 s at 72 °C, with a final extension step at 72 °C, 3 min.

Transgene copy number per Citrus genome for *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys* and the combination of both was determined by quantitative PCR (qPCR). Leaf DNA was extracted from tissue samples collected 60 days after agro-infiltration; as an endogenous control, a 200 bp fragment of the *C. sinensis* COX gene was employed. The above-mentioned primers were used, in combination with SYBR Green as fluorophore (Sigma-Aldrich, Mexico); the reactions were set on a Corbett Rotorgene RG-3000 apparatus (Corbett Research, Australia), following the manufacturer's instructions. The cycle conditions used were as follows: 94 °C for 20 s followed by 40 cycles at 94 °C for 1 s and 58 °C for 40 s.

#### 2.6. RNA isolation

Leaf RNA from young shoots from control and treated plants was obtained as follows. The petiole was first removed and the leaf blade was then ground with a TissueLyser apparatus and RNA then purified with an RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was then incubated with DNaseI (Promega; Madison WI) to remove contaminant DNA for real-time quantitative

reverse transcriptase coupled-PCR (qRT-PCR) analysis.

#### 2.7. RNA detection and quantification

qRT-PCR was performed with a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA). Briefly, DNase I-treated RNA was added to a 20 µl reaction mixture containing 10 µl of Kapa SYBR FAST qPCR master mix (Sigma-Aldrich), 10 µM primers, 200 ng of total RNA and 1 µl ROX high (Biorad, Hercules CA). Assay mixture was prepared with the primers: Defensin mRNA: qDef5' 5'-TATGCCACTTCCAGGTGTTT-3', qDef3' 5'-AAACTGGATGGCAAATAGCAC-3'; Lysozyme mRNA: qLys5' 5'-CAC CAGGTGCTGTTAATGCT-3', qLys3' 5'-ATTTCTCCAAGCAACCCAAG-3' and the endogenous *C. sinensis* COX mRNA: qCox5 5'-GTATGCCACGT CGCATTCCAGA-3', qCox3' 5'-GCCAAAAGTCTAAGGGCATTTC-3' (Sigma-Aldrich Mexico). RT-PCR conditions were: 50 °C for 30 min, 94 °C for 2 min and 40 cycles of 94 °C for 15 s, 58 °C for 35 s. Normalized mRNA accumulation was calculated employing the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001), obtained with the StepOne Plus software (Applied Biosystems).

#### 2.8. Confocal microscopy

Leaves from Mexican lime, transformed with the *CmPP16-Def-GFP* fusion construct were collected, sectioned manually employing a surgical blade on a glass slide, to obtain section of 3 mm. Sections were submerged in water and analyzed immediately with a Leica confocal laser-scanning microscope (model TC-SP5/MO-TANDEM) at the LanSE facility in CINVESTAV-Mexico City, using a krypton/argon laser and the following filter settings: 488 nm excitation and 525 nm emission for green fluorescence, and 580/665 nm for chlorophyll autofluorescence. All images were recorded and analyzed with Leica Las AF software, followed by processing with Photoshop 8.0 software (Adobe), as described previously (Xoconostle-Cázares et al., 1999).

#### 2.9. Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical assays were performed, as previously reported (Ruiz-Medrano et al., 1999), with the following modifications: Fresh stem and leaf tissue, sampled sixty-days after local transformation with *A. tumefaciens*, were immersed in fixative solution (FAA; 3.7% formaldehyde, 5% acetic acid and 50% ethanol) for 12 h and then dehydrated in an ethanol series (30, 50, 70 and 90%). Tissue was then immersed overnight in 95% ethanol with 0.01% Safranin O. Two changes with 100% ethanol, followed by two changes with acetone, for 30 min each, were performed, then followed by an overnight incubation with 100% CitriSolv and then gradual replacement with melted paraffin. 5 µm semi-thin cross sections were obtained using a rotary microtome HM 315. Rehydrated sections were blocked with PBS, containing 1% BSA and incubated overnight with a 1:1000 dilution of anti-human defensin polyclonal antibody, raised in rabbit (200 µg/mL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX). Sections were then incubated in a secondary antibody (anti-rabbit IgG coupled to alkaline phosphatase, Santa Cruz Biotechnology) and rinsed under stringent conditions with PBS-Tween 20. The interaction was treated with NBT/BCIP until a blue signal was observed and the enzymatic reaction was then stopped by addition of 50 mM EDTA at pH 8.0. Sections were photographed with a DS-Ri1 camera (Nikon México) mounted on an Optiphot-2 microscope (Nikon), and processed using NIS software (Nikon).

#### 2.10. Photosynthesis measurements

An IRGA LI-6400 TX apparatus (LiCor Biosciences, Lincoln, NE) with an internal radiation lamp set at 800 µmol quanta/m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, was employed to measure CO<sub>2</sub> fixation, which was similar to the natural radiation into the greenhouse. The IRGA probe employed contains an

internal area of 3 cm<sup>2</sup>, tree attached leaves bigger than this area were carefully located into the probe and photosynthesis rate was measured after one minute of isolating the leaf. Six different leaves were analyzed per plant and values were averaged. Also, measurements were carried out for younger fully expanded leaves. Since the measurement is not destructive, leaves continued attached to the citrus trees.

### 2.11. Quantification of CLAs in plant samples

Total DNA was obtained using DNeasy kit (Qiagen) using 100 mg of leaf mid-vein. Bacterial viability was quantified by Ethidium Monoazide-Treated DNA, followed by PCR (EMA-PCR), essentially as previously described (Trivedi et al., 2009). EMA enters to non-permeable dead cells and binds to DNA, it also binds to free DNA from lysed bacteria. In the presence of light, EMA covalently binds to DNA; which cannot be longer used by Taq polymerase as template; quantification of CLAs from EMA-PCR represents live bacteria. A parallel PCR assayed with DNA without EMA treatment detects total bacteria. The arithmetic subtraction of total PCR minus EMA-PCR represents dead bacteria. Considering EMA is light sensitive, aliquots were stored in dark microtubes and DNA treatment was always performed in the dark, while its inactivation was also carefully assayed checking light intensity. In this case, two samples were assayed by triplicate, one corresponding to the direct DNA extraction and the other to EMA-DNA extraction, to calculate the ratio of dead and live cells to the total number of cells. To determine the number of CLAs cells, a calibration curve was established using, as standard, a 700 bp 16S rRNA fragment from this bacterium. To this end, the recombinant-plasmid concentration was measured using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham MA) and standardized from  $2 \times 10^7$  to 200 copies per PCR reaction. Plasmid copy number was calculated based on the molecular weight using the following formula: Number of copies = (Amount in ng  $\times$  Avogadro's Number)/(Length in bp  $\times 1 \times 10^9 \times 650$ ), considering an average molecular weight of 650 Da for each nucleotide.

Real time PCR reactions contained 240 nM target primer HLBas/HLBr, 120 nM target probe HLBp, 240 nM target primer internal control primer Coxf/Coxr, 120 nM target internal control probe Cox, 1X PCR buffer, 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 240  $\mu$ M dNTPs and 1 unit Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). For qPCR, a RG-3000 Real Time PCR system; conditions for this amplification were 94 °C for 20 s followed by 40 cycles at 95 °C for 1 s and 58 °C for 40 s (Wang et al., 2016).

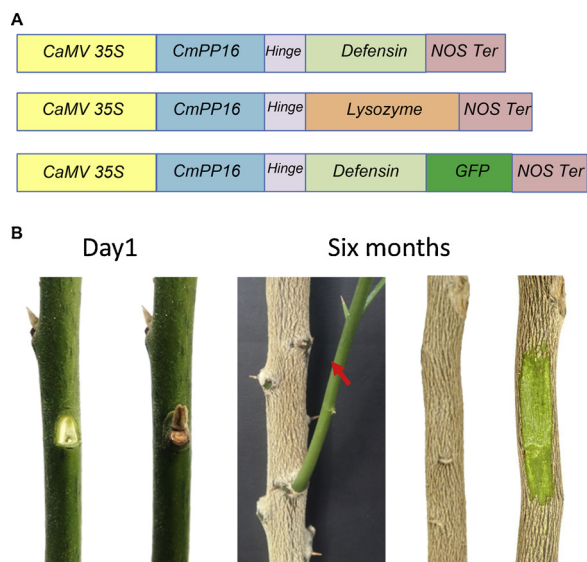
### 2.12. Statistical analysis

To assess significant differences between treatments with the various antimicrobials, analysis of variance (ANOVA) was employed to compare the means of pair groups (each treatment and control). When significant differences were observed in compared treatments and controls, Fisher's Least Significant Difference test (LSD) was then calculated to determine the higher limit allowed between each treatment mean, in order to consider whether they belong to the same population; then, the real difference was calculated between the population average, relative to the LSD. The non-parametric statistical test Kruskal-Wallis was also employed. The analysis of different populations are described in Supplementary Tables 1–5.

## 3. Results

### 3.1. CmPP16-Lysozyme and $\beta$ -defensin 2 fusion proteins move systemically in Mexican lime

To deliver antimicrobial peptides into the plant vascular system, both human lysozyme and  $\beta$ -defensin 2 sequences were translationally fused to the 3'-end of the CmPP16 open reading frame (ORF), to yield CmPP16-Lys and CmPP16-Def constructs. To enhance correct folding of both proteins, a flexible linker rich in glycine and alanine was added as



**Fig. 1.** Expression of antimicrobial proteins fused to CmPP16, a phloem-specific protein.

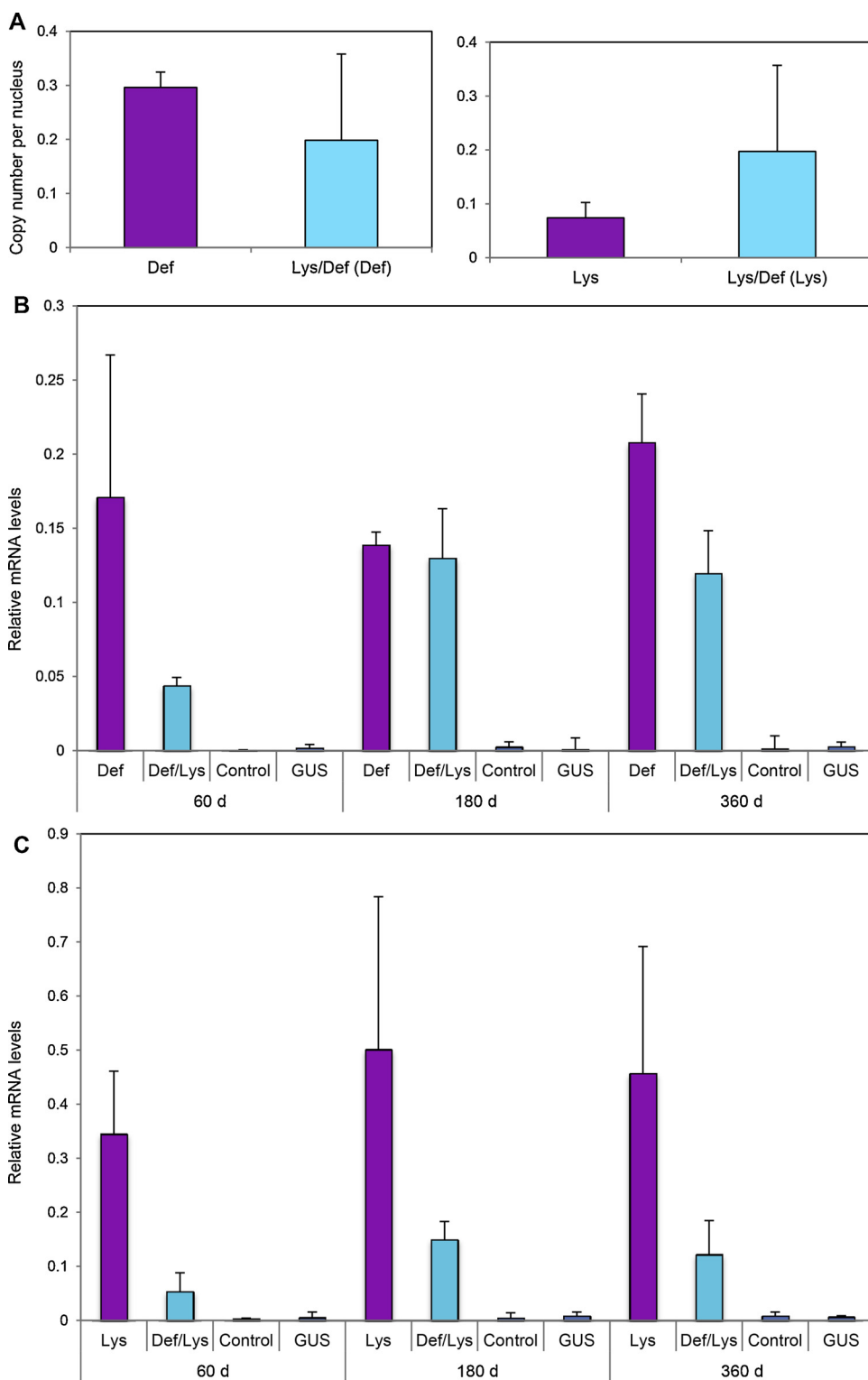
(A) Constructs were driven by the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter (CaMV 35S) and a NOS terminator (NOS Ter). The CmPP16 ORF was fused in-frame to a flexible linker, and the following antimicrobial peptides; human defensin, human lysozyme, or defensin-GFP. (B) *Citrus volkameriana* was used as rootstock naturally infected with HLB. An axillary bud was excised from the rootstock (left); Mexican lime scion was grafted onto this site (middle). After six months, once the scion was established, stems were observed (painted with the red arrow) its main stem was abraded to expose the underlying green tissue (right). Agrobacteria was then inoculated onto this tissue. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

a hinge between both ORFs (Wriggers et al., 2005) (Fig. 1A; Supplementary Fig. S1). Mexican lime bud scions were grafted onto CLAs-infected *C. volkameriana* (Fig. 1B) The lateral incision is observed on the left picture, where the bud with same dimension of *Citrus aurantifolia* was inserted. After six months of grafting, branches of *C. aurantifolia* appeared, showed in the central picture with the red arrow. Corked stems were transformed locally with *Agrobacterium tumefaciens*. Fig. 1B, right pictures. A blade was employed to expose the photosynthetic green tissue and incubated with *A. tumefaciens*, as described in M & M.

The genetic transformation was confirmed by PCR amplification of DNA extracted from leaves, excised from the inoculation site; ten independent lines were assayed. In some cases, the transgene was not detected likely due to the tissue being a genetic mosaic (Supplementary Fig. S2). Indeed, in the positive lines the transgenes were detected by qPCR at a proportion lower than nuclear DNA; this supports the notion that the analyzed leaves are genetic mosaics regarding the presence of the transgene (Fig. 2A).

In parallel, the transcript levels of CmPP16-Def and CmPP16-Lys were determined by qRT-PCR in young leaves that emerged after transformation. These transgenes were also detected in systemic leaves sampled 60, 180 and 360 days after transformation, indicating that they are expressed for extended periods (Fig. 2B). However, the levels for these transcripts were generally lower in the situation where both constructs were simultaneously agro-infiltrated (Fig. 2B).

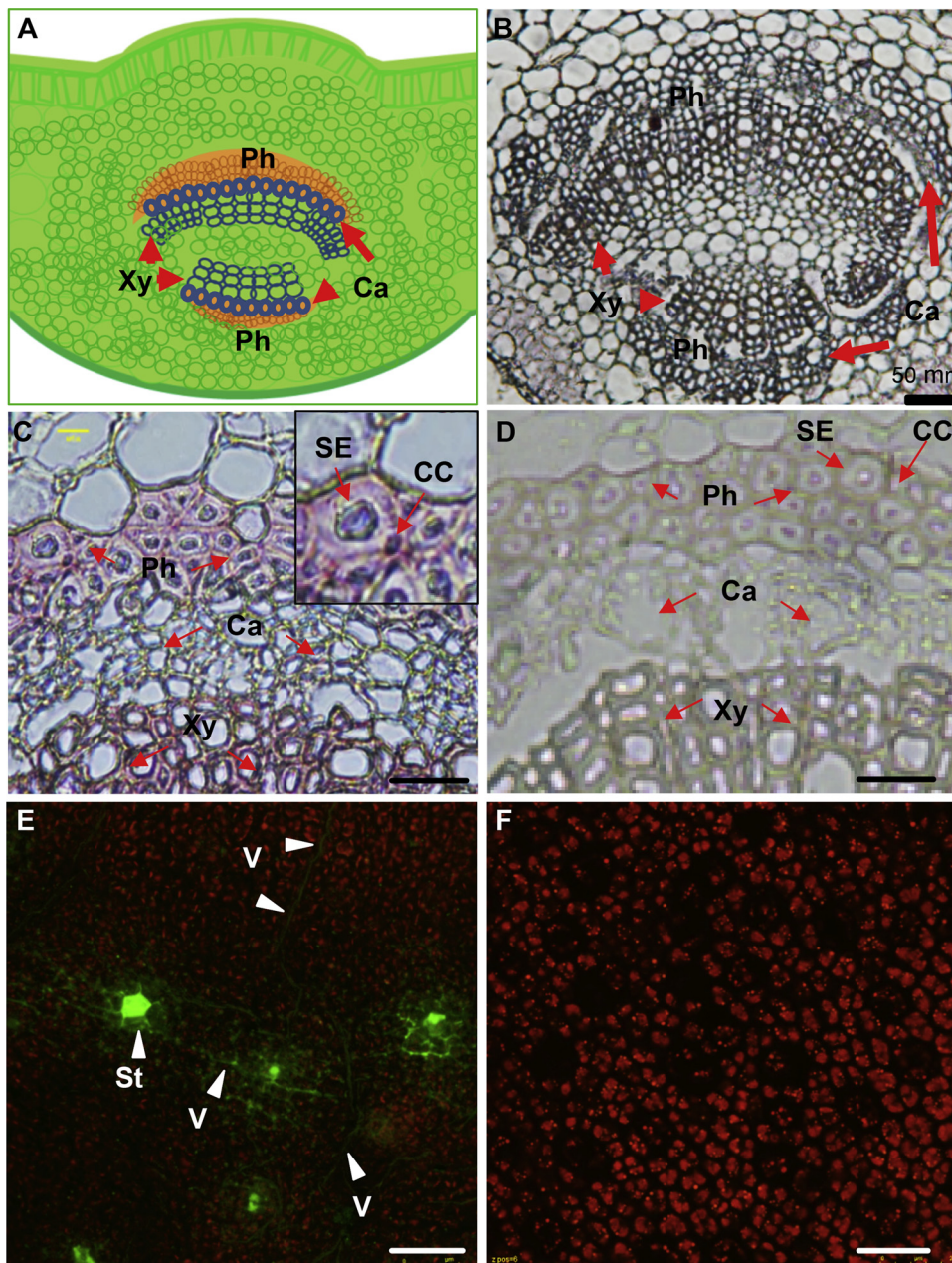
Immunolocalization of CmPP16-Def was also carried out to determine its tissue distribution in the midvein from leaves in which the mRNA had been already detected. A diagrammatic representation of a cross section of a leaf midrib and an untreated section are shown in Fig. 3A and B. Indol-color associated signal, corresponding to CmPP16-Def was detected in the CC-SE complex (Fig. 3C); in contrast, no signal was observed when the tissue was treated with preimmune serum (Fig. 3D). This indicated that CmPP16-Def, synthesized within the agro-



**Fig. 2.** Quantification of *CmPP16-Def* and *CmPP16-Lys* gene copy number and transcripts in transformed Mexican lime plants. **(A)** mRNA accumulation was determined in leaves closest to the inoculation site. DNaseI-treated total RNA was employed to determine mRNA abundance by quantitative real-time PCR and normalized against cytochrome oxidase (*COX*) mRNA as an endogenous control, using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). **(B)** *CmPP16-Def* transcript levels in leaves from young shoots at 60, 180 and 360 days after agro-infiltration. Control indicates untreated HLB-infected plants **(C)**. *CmPP16-Lys* transcript levels at 60, 180 and 360 days after agro-infiltration. Bars indicate standard deviation.

inoculation sites, was able to move systemically into new leaves; and, additionally, to accumulate in the functional phloem, which is the site where CLas accumulates. To further identify the tissues and cell types in which these fusion proteins accumulate, after sixty days of local genetic transformation, human defensin was detected using monoclonal antibodies. Detection of human lysozyme was not conclusive due to the background observed in control plants (data not shown). Additional Mexican lime plants were inoculated with constructs in which the *GFP* ORF was added to the 3'-end of the *CmPP16-Def* construct. Leaf blades

were agro-infiltrated and seven days later were analyzed by confocal laser microscopy. Here, signal was detected in minor veins (Fig. 3E, F). These assays confirmed the capacity of this *CmPP16-DEF-GFP* fusion protein to enter and accumulate in vascular tissue of adult Mexican lime plants, following agro-infiltration. Leaf blades locally expressing the fusion *CmPP16-Def-GFP* were not challenged to HLB infection.



**Fig. 3.** CmPP16-Defensin fusion protein accumulates in the vascular tissue in leaves, and localizes to minor veins of agro-infiltrated leaves.

(A) Diagram of transverse section of leaf midrib. Ph, Phloem; Xy, Xylem; Ca, Cambium (B). Transverse fresh section of midrib showing vascular tissue. (C) Immunolocalization of CmPP16-Def within the sclerenchyma and phloem. Red arrows indicates phloem cells, cambium and xylem. Inset in (C) shows a magnified Sieve Element (SE) and its Companion Cell, (CC) pointed with red arrows. (D) Control, midrib from wild-type Mexican lime; Red arrows indicates phloem cells, cambium and xylem. (E) and (F) Cellular localization of CmPP16-Defensin-GFP fusion protein in agro-infiltrated Mexican lime leaves. Tissue was analyzed three days after transformation. (E) Fluorescent mesophyll cells and minor veins. (F) Control, untransformed Citrus leaf. St, stomata; V, veins. Bars in (E) and (F) are 50  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3.2. Plants treated with antimicrobial fusion proteins displayed ameliorated symptoms

We next assessed whether the treatment affected disease symptom development. Inoculated and control plants were monitored for symptom development over a 360 day period. Mature leaves, already present before agro-infiltration of the various constructs, showed typical HLB blotchy mottle. HLB-associated symptoms started to develop on untreated control leaves by 60 days after agro-infiltration (Fig. 4A). By contrast, newly formed leaves from scions treated with *A. tumefaciens* harboring CmPP16-Def (Fig. 4B and C) or CmPP16-Lys (Fig. 4D) constructs showed little to no symptoms.

Similarly, leaves from scions treated with a mixture of the *A. tumefaciens* strains containing both constructs also exhibited only mild HLB-associated symptoms. Additionally, shoots were longer in plants treated with either or both constructs than in controls (see below). In general, all older leaves displayed blotchy mottle, but treated trees had young flush with no symptoms. Most infected trees show no symptoms

in young flush. These findings suggested that the fusion proteins are able to reach the phloem tissues, whereby they appear to reduce CLAs symptoms.

### 3.3. Plants treated with chimeric antimicrobial constructs showed reduced CLAs titers

Pre-existing mature leaves and newly emerged leaves were collected and tissues were tested for the presence of CLAs; live or dead bacterial content was also estimated using EMA-PCR (Fig. 5). Considering DNA and RNA are stable molecules in the phloem stream (Xoconostle-Cázares et al., 1999; Ruiz-Medrano et al., 1999; Kim et al., 2014), to assess the effect of the antimicrobial proteins on CLAs viability, it was considered important to quantify whether CLAs DNA was detected from circulating CLAs DNA from dead bacteria or still live CLAs within the vascular tissue. To quantify the number of bacteria present, calibration curves were calculated (Supplementary Fig. S3). Bacteria content is represented as CLAs number  $\times 10^3$  per  $\mu$ g-1 total DNA (Fig. 5). Total

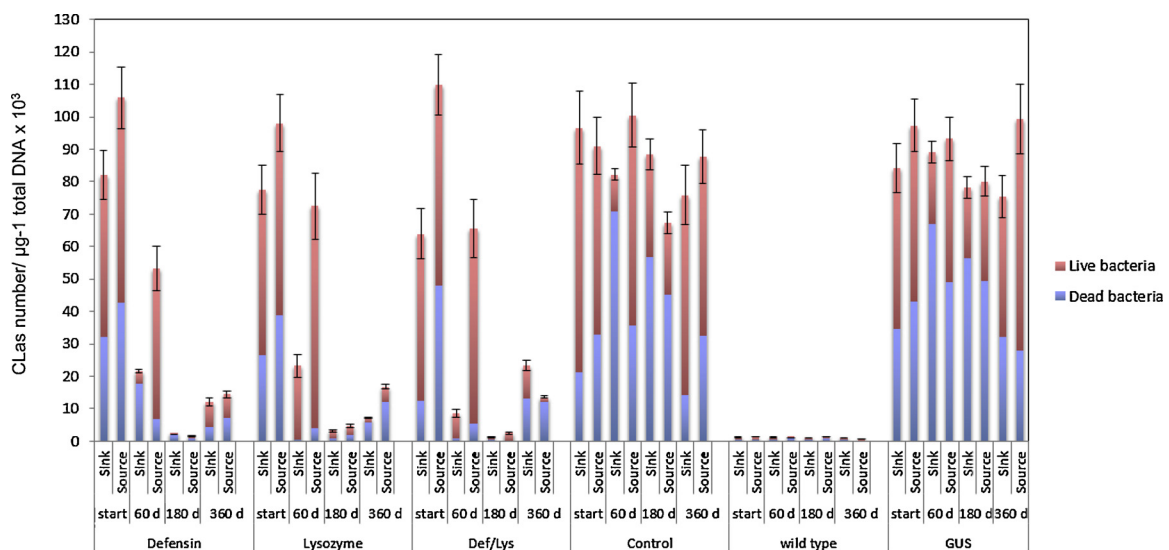




**Fig. 4.** Newly formed leaves from agro-infiltrated plants with *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys* and their mixture showed reduced symptoms relative to untreated HLB-infected control plants. (A) Untreated HLB-infected plant. (B) Plant agro-infiltrated with the *CmPP16-Def* construct. (C) Plant agro-infiltrated with *CmPP16-Lys* construct. (D) and (E) Plants treated with both *CmPP16-Def* and *CmPP16-Lys* constructs. Asterisks indicate leaves with no symptoms.

content is represented with the blue plus red bars, while live bacteria is showed with blue color; live bacteria is shown in red. The amount of live bacteria decreased in all treated plants, with the most notable effect being in sink leaves (Fig. 5). A decrease in CLas titer was observed in plants treated with *A. tumefaciens* harboring either antimicrobial or a combination of both, starting 60 days after infiltration. Indeed, plants expressing antimicrobials showed between 80–95% lower bacterial content in sink leaves than in the infected control plants or infected

expressing GUS. To identify statistically significant differences in bacterial content between untreated controls (healthy and HLB-infected), as well as in plants agro-infiltrated with constructs expressing the antimicrobials, ANOVA one-way test, followed by LSD analysis and the non-parametric Kruskal-Wallis test were performed. Significant differences were identified from 60 days of antimicrobial expression when dead bacteria was compared. To note is the CLas decrease in sink tissue, consistent with the movement of phloem sap from source to sink



**Fig. 5.** CLas content in treated and untreated Mexican lime scions.

Las genome equivalents were obtained by qPCR from scions expressing *CmPP16-Def* (Def), *CmPP16-Lys* (Lys), the mixture (Def/Lys), and untreated plants (HLB-infected control and GUS), as well as healthy plants. CLas content was determined in source leaves of plants at the start of treatment, 60, 180 and 360 days after agro-infiltration. Upper portion of bars with red color indicate dead bacteria, while lower portions with blue color, indicate live bacteria. Bars indicate standard deviation for total CLas population. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

tissues, were in general, the CLAs decrease was not as marked in source leaves. The comparison of live bacteria among the treatments and control untreated plants shows no difference at the starting and 60 days after the expression of antimicrobials. Significant differences were observed from 180 to 360 days. (Statistic calculation are presented in Supplementary Tables 1–4). Healthy control plants were also tested, in which no CLAs was undetectable, in agreement with the absence of insect vector in the greenhouse conditions. These findings are consistent with the notion that the fusion proteins, and/or their transcript, have the capacity to move systemically to distant tissues. We also observed that bacterial content fluctuated, during the 360-day experimental period; indeed, after this period, a decrease in CLAs was also observed in control plants. This finding is consistent with a recent report (López-Buenfil et al., 2017), in which seasonal fluctuation were registered.

### 3.4. Plants locally expressing antimicrobial fusion proteins display favorable traits relative to infected untreated controls

We next assessed whether the lower CLAs titer was associated with an improved physiological status of the agro-inoculated plants. To this end, photosynthetic capacity was measured as carbon fixation ( $\text{mmol CO}_2/\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ), at the treatment onset, and subsequently 60, 180 and 360 days later. Interestingly, expression of *CmPP16-Def* or *CmPP16-Lys*, or the combined treatment, resulted in the maintenance of photosynthetic capacity equivalent to healthy control plants, whereas the HLB-infected plants displayed a decrease (Fig. 6). Statistic differences were identified by analyzing the photosynthesis capacity with one-way ANOVA followed by LSD test, as well as with Krustal-Wallis test (Supplementary Tables 4 and 5). The comparison of  $\text{CO}_2$  fixation among the treatments and control untreated plants shows no difference at the starting and 60 days after the expression of the antimicrobials.

Significant differences were observed from 180 to 360 days.

It was also noticed that, as a rule, treated plants displayed more and longer shoots than untreated plants. As a proxy of total foliar area, the product of shoot length and shoot number, for each treatment, was determined 360 days after the onset of the experiment. This parameter was noticeably larger in treated versus untreated plants (Supplementary Fig. S4), indicating that plants treated with the antimicrobial fusion proteins were more vigorous than untreated plants. Assayed was considered to have provided conclusive results when at 360 days, control and GUS-expressing plants had shown defoliated branches, and their leaves were fully symptomatic.

## 4. Discussion

In addition to systemic viruses, several microbial pathogens are able to access the phloem translocation stream of their plants hosts, such as phytoplasmas and CLAs. The presence of the bacterial pathogen in the phloem presents a challenge, since externally applied chemical control agents (such as antibiotics) do not generally gain access to this tissue. Thus, we devised a strategy to target antimicrobial peptides to the phloem by translationally fusing them to a phloem-resident protein, CmPP16 (Xoconostle-Cázares et al., 1999). While plants harbor several defensin and thionin genes with significant antimicrobial activity, these are not present in the phloem translocation stream, or at least not reported in extant phloem proteome databases from several species, and would thus require targeted expression in the phloem (Givalisco et al., 2006; Lin et al., 2009; Rodriguez-Medina et al., 2011).

Expression of defensins under the control of CC-specific promoters, such as *SUC2*, has promise in treating pathogens able to colonize the phloem, but fusion to a SE-targeted protein, such as CmPP16, may enhance accumulation of the antimicrobial protein in this cell type, where CLAs ultimately resides. In order to avoid potential allergenic

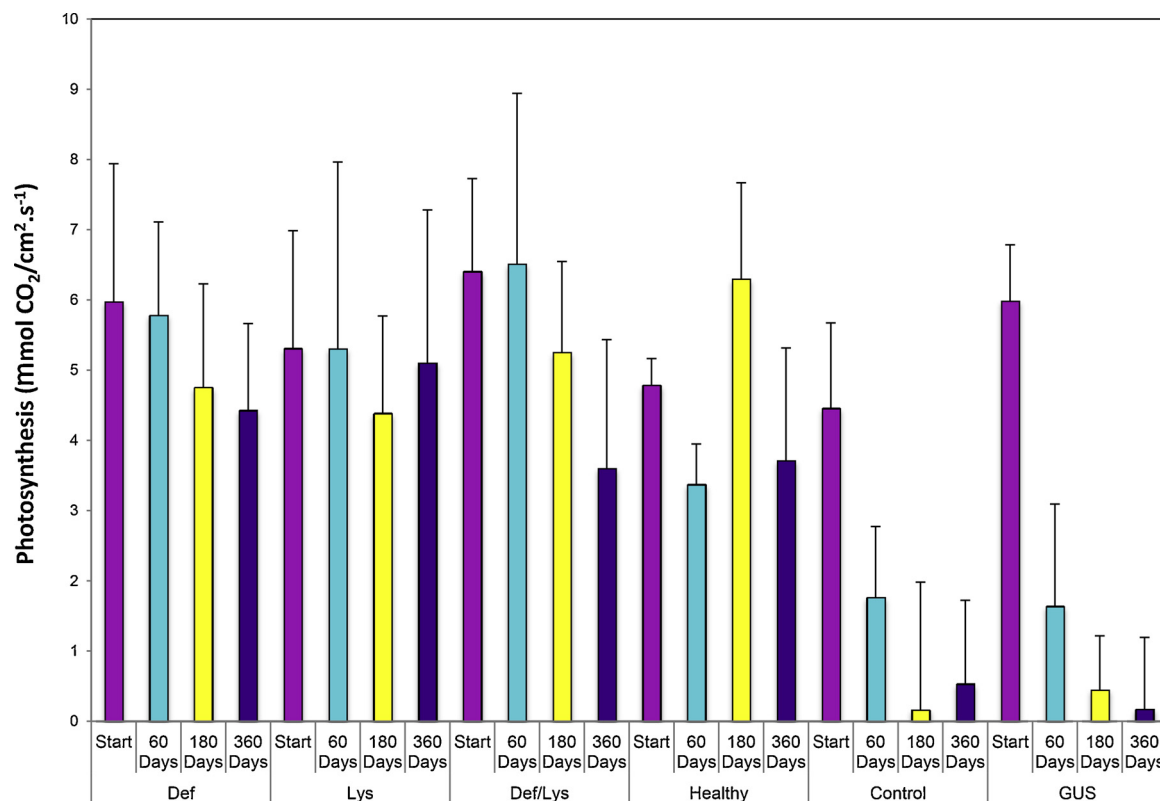


Fig. 6. Photosynthetic capacities in HLB-infected control plants expressing *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys*, and the mixture.

Photosynthetic rates were measured on mature leaves of HLB-infected Mexican lime plants expressing *CmPP16-Def*, *CmPP16-Lys*, *CmPP16-Def* and *CmPP16-Lys*, *GUS*, and HLB-infected Mexican lime trees agro-infiltrated with *A. tumefaciens* only (control). Healthy Mexican lime plants served as an additional control (Healthy). Measurements were carried out at the start, 60, 180 and 360 days after agro-infiltration.

reactions to foreign proteins in human consumers,  $\beta$ -defensin 2 and lysozyme of human origin were selected, both play an important role in innate immunity, and are largely expressed in epithelial tissues; indeed, it has been proposed its clinical use for controlling bacterial multi-resistance (Dong et al., 2016; Pachón-Ibáñez et al., 2017). Both antimicrobial proteins are expressed in the human body, and biosafety issues have been studied thoroughly (Brundige et al., 2008; Wang et al., 2016).  $\beta$ -defensin 2 forms pores in the membrane of target organisms, mainly eubacteria and fungi; it has been shown to confer resistance to different fungi when expressed in *Arabidopsis* (Aerts et al., 2007). Lysozyme hydrolyzes peptidoglycan in gram-positive bacteria, and under high hydrostatic pressure (a condition present in the plant sieve tube system) gram-negative bacteria also display susceptibility (Masschalck et al., 2001).

CmPP16 is a protein that accumulates in the mature functional phloem and may be involved in the response to stress, given that its homologs in rice and other plant species are induced by fungal elicitors, and their transient expression can provide drought tolerance (Ramírez-Ortega et al., 2014). Furthermore, the homologues of this protein are present in proteomic databases of edible fruits, such as pumpkin, cucumber, and *Citrus sinensis* (Ruiz-Medrano and Xoconostle-Cázares, unpublished results), suggesting that it is likely not toxic to humans.

As an speculation, the unexpected effects on shoot length and number observed in treated plants suggests that these proteins, despite of its human origin, may have additional functions in plants, at least in the case of defensin. Indeed, this is supported by the role of defensin in early flower and embryo development, as well as in pollen tube guidance (Balandín et al., 2005; Okuda et al., 2009; Stotz et al., 2009).

In the present study, a substantial decrease in CLas titer was observed in Mexican lime treated with either lysozyme or defensin fused to CmPP16, or the mixture of both, which was more marked 180 days after the start of the experiment. At 360 days the CLas titer increased somewhat, which could reflect decreasing amounts of synthesized antimicrobials, and/or the fluctuations observed in bacterial concentration in HLB-infected plants (López-Buenfil et al., 2017).

Older mature leaves remained symptomatic, due to the accumulation of starch, which seems not to be metabolized by the plant cells despite of the lower bacterial content. By contrast, new fully expanded leaves from plants treated with the different antimicrobial fusion proteins showed markedly reduced symptoms. Moreover, these leaves harbored the lowest levels of CLas of all treated plants examined. This finding supports the hypothesis that the antimicrobial protein (or its RNA) can move long-distance into young leaves. Detection of fusion protein in vascular bundles, and, in particular, in the phloem, provides further support for this hypothesis. Interestingly, the CmPP16-defensin-GFP fusion (as determined by GFP-associated fluorescence, Fig. 3) accumulated in only a few cell types; one might have expected this fusion protein to accumulate in most cell types in inoculated leaves, given that its expression was driven by the constitutive CaMV 35S promoter. However, as CmPP16 is a non-cell-autonomous protein (NCAP), it can traffic cell to cell and appears to move preferentially to certain cell types, a situation shown also for AtTCTP2, an *Arabidopsis* NCAP (Toscano-Morales et al., 2015).

The enhanced photosynthetic performance of plants that underwent an antimicrobial treatment may be attributed to an improvement of the general physiological status achieved two months after the inoculation.

Our findings indicate that the local expression of antimicrobial peptides fused to proteins present in the SE is sufficient for systemic delivery of the fusion transcript and/or protein to infected tissue. Another interesting point is that the tissue that was initially agro-inoculated maintained production of the fusion transcript and its protein for many months. Thus, this strategy could be used to inoculate rootstocks to protect non-GM scions and non-GM fruits. It could also be used to target proteins of interest to the plant vascular tissue, and to tree species, in particular those prone to disease. Finally, defensins have been expressed in different plant species, and shown to confer

resistance to bacteria and fungi (Stotz et al., 2009). Citrus plants expressing a modified thionin, a protein related to animal defensins, show resistance not only to CLas, but also to *Xanthomonas citri*, the causal agent of citrus canker (Hao et al., 2016). Thus, defensin with dual localization in phloem and xylem could also be used to protect plants afflicted with similar diseases. It is important to mention that the results obtained in this study were obtained under greenhouse conditions, in which plants were not being re-inoculated by vectors harboring CLas. Thus, it will be of interest to determine the behavior of plants expressing antimicrobials in open field trials where HLB is prevalent.

#### Author contributions

B.X.-C. and R.R.-M. planned the experimental strategy, designed the constructs and wrote and revised the manuscript; M.A.G.-L. carried out the agro-infiltration experiments, qPCR and qRT-PCR, and confocal microscopy analyses; F.A.R.-O. carried out agro-infiltration experiments, and performed the statistical analysis; E.L.-K. carried out grafting experiments, and coordinated plant maintenance; J.J.H.M. assisted with agro-infiltration experiments; F.A.R.-O., C.C.-P., O.M.-G. and J.A.L.-B. carried out the statistical analysis and contributed to revising the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

#### Disclosure of potential conflict of interest

The strategy to fuse proteins of interest to sieve-element specific proteins is part of the patent filed on behalf of CINVESTAV-IPN.

#### Acknowledgments

This work was supported by SENASICA grants to B.X.-C. and R.R.-M. M.A.G.-L. and F.A.R.-O. were supported by doctoral fellowship from CONACyT. J.A.R.-P. received M.Sc. fellowship support from CONACyT. We are grateful to our anonymous reviewers for their constructive suggestions. We thank Rebeca Zecua-Nájera and Andrea Gómez-Felipe for technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.012>.

#### References

- Aerts, A.M., Thevissen, K., Bresseleers, S.M., Sels, J., Wouters, P., Cammue, B.P., François, I.E., 2007. *Arabidopsis thaliana* plants expressing human beta-defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. *Plant Cell Rep.* 26 (8), 1391–1398.
- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., Sakakibara, H., 2005. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell* 17 (6), 1801–1814.
- Balandín, M., Royo, J., Gómez, E., Muniz, L.M., Molina, A., Hueros, G., 2005. A protective role for the embryo-surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol. Biol.* 58 (2), 269–282.
- Bové, J.M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88 (1), 7–37.
- Brundige, D.R., Maga, E.A., Klasing, K.C., Murray, J.D., 2008. Lysozyme in transgenic goats' milk influences gastrointestinal morphology in young pigs. *J. Nutr.* 138 (5), 921–926.
- Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., Rodríguez-García, M., López, Y., Aranguren, M., Alonso, E., Delgado, R., Luis, M., Batista, L., Paredes, C., Rodríguez, M., Pujol, M., Ochagavía, E., Falcón, V., Terauchi, R., Matsumura, H., Ayra-Pardo, C., Llauger, R., Pérez, M.C., Núñez, M., Borrusch, M.S., Walton, J.D., Silva, Y., Pimentel, E., Borroto, C., Borrás-Hidalgo, O., 2016. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', causal agent of citrus huanglongbing is reduced by treatment with brassinosteroids. *PLoS One* 5 (11), e0146223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146223>.
- da Graça, J.V., Douhan, G.W., Halbert, S.E., Keremane, M.L., Lee, R.F., Vidalakis, G., Zhao, H., 2016. Huanglongbing: an overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *J. Integr. Plant Biol.* 58 (4), 373–387. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>.

- Ding, F., Duan, Y., Paul, C., Brlansky, R.H., Hartung, J.S., 2015. Localization and distribution of 'Candidatus liberibacter asiaticus' in citrus and periwinkle by direct tissue blot immuno assay with an Anti-OmpA polyclonal antibody. *PLoS One* 10 (5), e0123939.
- Dong, H., Lv, Y., Zhao, D., Barrow, P., Zhou, X., 2016. Defensins: the sase for their use against mycobacterial infections. *J. Immunol. Res.* 2016, 7515687.
- Dutt, M., Barthe, G., Irely, M., Grosser, J., 2015. Transgenic citrus expressing an arabisopsis npr1 gene exhibit enhanced resistance against huanglongbing (HLB; citrus greening). *PLoS One* 11 (1), e0147657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>.
- Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A., Kehr, J., 2006. Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* 6 (3), 896–909. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500155>.
- Ham, B.K., Lucas, W.J., 2017. Phloem-mobile RNAs as systemic signaling agents. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 173–195.
- Hao, G., Boyle, M., Zhou, L., Duan, Y., 2013. The intracellular citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' encodes two novel autotransporters. *PLoS One* 8 (7) e68921.
- Hao, G., Stover, E., Gupta, G., 2016. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and huanglongbing (HLB). *Front. Plant Sci.* 7, 1078. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01078>.
- Hu, J., Jiang, J., Wang, N., 2018. Control of citrus huanglongbing (HLB) via trunk injection of plant activators and antibiotics. *Phytopathology* 108 (2), 186–195.
- Johnson, E.G., Wu, J., Bright, D.B., Graham, J.H., 2014. Association of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol.* 63 (2), 290–298. <https://doi.org/10.1111/ppa.12109>.
- Kim, G., LeBlanc, M.L., Wafula, E.K., dePamphilis, C.W., Westwood, J.H., 2014. Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science* 345 (6198), 808–811.
- Koh, E.J., Zhou, L., Williams, D.S., 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 (3), 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0312-3>.
- Li, W., Levy, L., Hartung, J.S., 2009. Quantitative distribution of 'Candidatus liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99 (2), 139–144.
- Li, J., Trivedi, P., Wang, N., 2016. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus huanglongbing. *Phytopathology* 106 (1), 37–46. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0196-R>.
- Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S., Lucas, W.J., 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol. Cell Proteomics* 8, 343–356. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800420-MCP200>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- López-Buenfil, J.A., Ramírez-Pool, J.A., Ruiz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, M.C., Chavarín-Palacio, C., Moya-Hinojosa, J.J., Trujillo-Arriaga, F.J., Lira-Carmona, R., Xoconostle-Cázares, B., 2017. Dynamics of huanglongbing-associated bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus aurantifolia* Swingle (Mexican lime). *Pak. J. Biol. Sci.* 20 (3), 113–123. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.113.123>.
- Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.R., Helariutta, Y., He, X.Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S.M., Patrick, J.W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A.F., Grusak, M.A., Kachroo, P., 2013. The plant vascular system: evolution, development and functions. *J. Integr. Plant Biol.* 55 (4), 294–388. <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E.G., Michiels, C.W., 2001. Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), 339–344.
- Mirkov, T.E., Gonzalez-Ramos J., 2012. Pathogen resistant citrus compositions, organisms, systems, and methods. US Patent US20130205443A1.
- Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A., Kanaoka, M.M., Dresselhaus, T., Sasaki, N., Higashiyama, T., 2009. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458 (7236), 357–361. <https://doi.org/10.1038/nature07882>.
- Pachón-Ibáñez, M.E., Smani, Y., Pachón, J., Sánchez-Céspedes, J., 2017. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Rev.* 41 (3), 323–342.
- Patel, S., Akhtar, N., 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): the quintessential 'offense and defense' molecules are more than antimicrobials. *Biomed. Pharmacother.* 95, 1276–1283.
- Prasad, S., Xu, J., Zhang, Y., Wang, N., 2016. SEC-translocon dependent extracytoplasmic proteins of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Front. Microbiol.* 7, 1989.
- Ramírez-Ortega, F.A., Herrera-Pola, P.S., Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., 2014. Overexpression of the pumpkin (*Cucurbita maxima*) 16 kDa phloem protein CmPP16 increases tolerance to water deficit. *Plant Signal. Behav.* 9 (11), e973823. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.973823>.
- Rodríguez-Medina, C., Atkins, C.A., Mann, A.J., Jordan, M.E., Smith, P.M., 2011. Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.). *BMC Plant Biol.* 11 (36). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-36>.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J., 1999. Phloem long-distance transport of CmNACP-1 mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126 (20), 4405–4419.
- Stotz, H.U., Spence, B., Wang, Y., 2009. A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Mol. Biol.* 71 (1–2), 131–143.
- Toscano-Morales, R., Cabrera-Ponce, J.L., Xoconostle-Cázares, B., Hinojosa-Moya, J., Galván-Gordillo, V., Guevara-González, R.G., Ruiz-Medrano, R., 2015. AtTCTP2, an Arabidopsis thaliana homolog of translationally controlled tumor protein, enhances in vitro plant regeneration. *Front. Plant Sci.* 6, 468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00468>.
- Trivedi, P., Sagaram, U.S., Kim, J.-S., Brlansky, R.H., Rogers, M.E., Stelinski, L.L., Oswalt, C., Wang, N., 2009. Quantification of viable 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide. *Eur. J. Plant Pathol.* 124 (4), 553–563.
- Wang, H., Wu, H., Wang, K., Cao, Z., Yu, K., Lian, L., Lian, Z., 2016. Expression of recombinant human lysozyme in transgenic chicken promotes the growth of *Bifidobacterium* in the intestine and improves postnatal growth of chicken. *AMB Express* 6 (1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0280-2>.
- Wang, N., Pierson, E.A., Setubal, J.C., Xu, J., Levy, J.G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L.T., Martins Jr., J., 2017. The *candidatus liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55 (1), 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035513>.
- Wriggers, W., Chakravarty, S., Jennings, P.A., 2005. Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Biopolymers* 80 (6), 736–746.
- Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., Lucas, W.J., 1999. Plant paralogs to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283 (5398), 94–98.
- Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Lucas, W.J., 2000. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J.* 24 (6), 735–747.
- Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A.C., Ruiz-Medrano, R., 2016. Phloem long-distance trafficking of RNAs and proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021260.pub2>.