

# Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*

## Comparación de enzimas y compuesto fenólicos en tres especies de cítricos infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**Lidia Monserrat Flores-Torres, Alberto Flores-Olivas\*, Yisa María Ochoa-Fuentes.** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315; **J. Isabel López-Arroyo,** Campo Experimental INIFAP, Carretera Montemorelos-China Km. 31, Colonia Ex Hacienda Las Anacuas General Terán C.P. 67413, General Terán Nuevo León; **Víctor Olalde-Portugal,** Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte carretera. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, CP 36821, México; **Adalberto Benavides-Mendoza,** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315; **Susana González-Morales,** CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315; **Víctor Manuel Zamora-Villa,** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315. \*Autor para correspondencia: lidiaf2004@yahoo.com.mx, aflooli@uaaan.mx.

**Recibido:** 04 de septiembre, 2016. **Aceptado:** 13 de enero, 2017.

Flores-Torres LM, Flores-Olivas A, Ochoa-Fuentes YM, López-Arroyo JI, Olalde-Portugal V, Benavides-Mendoza A, González-Morales S, Zamora-Villa VM. 2017. Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 314-325.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1608-2

Primera publicación DOI: 5 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

**Resumen.** El objetivo fue determinar diferencias en la actividad enzimática antioxidante y la concentración de fenoles totales en plantas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka); y naranja dulce

**Abstract.** The objective was to determine differences in antioxidant enzyme activity and total phenol concentration in Mexican lime plants (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka); and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Infected under natural field conditions with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*CaLas*), in Bustamante, Tamaulipas, Mexico. The presence of *CaLas* was determined by qPCR. We determined the enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), which is activated by pathogen attack; the peroxidase involved in wall lignification in response to infection; the  $\alpha$ -amylase which degrades starch and accumulates in vascular tissue; and phenolic compounds involved in defense functions. A contrasts analysis was performed. Total protein concentration showed significant differences

Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), infectadas bajo condiciones naturales de campo con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*CaLas*), en Bustamante, Tamaulipas, México. Se determinó la presencia de *CaLas* por qPCR; la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL), que se activa ante el ataque de patógenos; peroxidasa que interviene en la lignificación de paredes como respuesta a la infección;  $\alpha$ -amilasa que degrada el almidón y se acumula en el tejido vascular, y compuestos fenólicos que cumplen funciones de defensa. Se realizó un análisis de contrastes. La concentración de proteínas totales mostró diferencias significativas entre especies ( $P < 0.0001$ ). Con una media de 6.1 y 6.37 mg de proteínas por g de tejido fresco para árboles infectados de limón mexicano; y naranja dulce negativa a *CaLas*. La actividad peroxidasa presentó diferencia significativa para limón persa ( $P = 0.0341$ ), con una media de 1.96 U·mg de proteína<sup>-1</sup>. En naranja dulce se observó mayor actividad de  $\alpha$  amilasa en los árboles infectados por *CaLas* (1.19 U·mg de proteína<sup>-1</sup>). La concentración de PAL y fenoles totales no mostraron diferencias significativas entre especies. En el presente estudio se observó que *CaLas* influye en la actividad enzimática de cítricos.

**Palabras clave:** Huanglongbing, Fenilalanina amonio liasa, peroxidasa,  $\alpha$ -amilasa, proteínas totales, fenoles totales.

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (*CaLas*), afecta las zonas productoras de cítricos en México (DGSV-SENASICA y Mora-Aguilera, 2012); reduce 18.6 % el volumen de jugo y 17.3 % el peso de fruto de limón persa en Yucatán, México; lo que provoca pérdidas de producción de 2.4 tha<sup>-1</sup> (Flores-Sánchez, *et al.*, 2015). La infección inducida por HLB, altera la exportación de fotoasimilados,

between species ( $P < 0.0001$ ). With a mean of 6.1 and 6.37 mg of protein per g of fresh tissue for infected Mexican lime trees, and sweet orange negative *CaLas*. The peroxidase activity presented a significant difference for Persian lime ( $P = 0.0341$ ), with a mean of 1.96 U·mg of protein<sup>-1</sup>. In sweet orange, higher  $\alpha$ -amylase activity was observed in *CaLas* infected trees (1.19 U·mg protein<sup>-1</sup>). The concentration of PAL and total phenols did not show significant differences between species. In the present study it was observed that *CaLas* influences the enzymatic activity of *Citrus* species.

**Key words:** Huanglongbing, Phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, alpha amylase, total proteins, total phenols.

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (*CaLas*), affects the citrus-producing areas in Mexico (DGSV-SENASICA and Mora-Aguilera, 2012); it reduces by 18.6 % the volume of juice and by 17.3 % the weight of fruits in Persian lime in Yucatan, Mexico, causing losses in production of 2.4 tha<sup>-1</sup> (Flores-Sánchez, *et al.*, 2015). The infection induced by HLB alters the export of photoassimilates caused by the retention of starch, which generates the expression of symptoms in the tree (Kim *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2012).

*CaLas* causes biochemical and structural changes in citrus plants to prevent the spread of the bacteria, by activating response proteins (Albrecht and Bowman, 2008). In response to the infection of citrus plants with HLB, carbohydrate metabolism involving  $\alpha$ -amylase is altered (Albrecht and Bowman, 2008; Etxeberria *et al.*, 2009).

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) intervenes in response to the attack of the pathogens (Almarino *et al.*, 1994). In citrics, the flavedo has the ability to respond to attacks by pathogens, by the increase of

provocada por la retención de almidón, lo que genera la expresión de síntomas en el árbol (Kim *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2012).

*CaLas* provoca cambios bioquímicos y estructurales en plantas de cítricos para evitar la diseminación de la bacteria, mediante la activación de proteínas de respuesta (Albrecht y Bowman, 2008). Como respuesta a la infección de plantas de cítricos con HLB, el metabolismo de carbohidratos en el que interviene la  $\alpha$  amilasa, es alterado (Albrecht y Bowman, 2008; Etxeberria *et al.*, 2009).

La fenilalanina amonio-liasa (PAL) interviene en respuesta al ataque de patógenos (Almarino *et al.*, 1994). En cítricos, se ha observado que el flavedo posee la capacidad de responder al ataque por patógenos, mediante el aumento de los niveles de transcrito de la PAL así como de su actividad (Ballester *et al.*, 2006). La enzima peroxidasa (POD) protege a las plantas del daño causado por radicales libres o ROS generados por diferentes tipos de estrés, participa también en la lignificación de la pared celular y en la degradación del ácido indolacético (Robinson, 1991). Se ha demostrado que los fenoles poseen una función importante en la defensa de las plantas frente a distintos factores bióticos y abióticos (Lu *et al.*, 2015). Éstas se pueden modificar por efectores que secretan las bacterias *Ca. Liberibacter* dentro del hospedante y que alteran genes relacionados con la defensa; *CaLas* codifica salicilato hidroxilasa como mecanismo para evadir la defensa de las plantas (Aritua *et al.*, 2013). Mora-Aguilera *et al.*, 2014, señalan que el manejo del HLB debe considerar la susceptibilidad de las especies de cítricos y la carga del inóculo. Entender el comportamiento enzimático de árboles infectados con *CaLas* en diferentes especies permitiría desarrollar alternativas para la protección o defensa de la planta. El estudio se desarrolló con el objetivo de determinar diferencias en la actividad enzimática antioxidante y concentración de fenoles

the PAL transcript levels, as well as of its activity (Ballester *et al.*, 2006). The enzyme peroxidase (POD) protects plants from the damage caused by the free radicals or ROS generated by different types of stress and also participates in the lignification of the cell wall and in the degeneration of indolacetic acid (Robinson, 1991). Phenols have proven to play an important part in the defense of plants to different biotic and abiotic factors (Lu *et al.*, 2015). They can be modified by effectors secreted by the bacteria *Ca. Liberibacter* inside the host, and that alter genes related to defense; *CaLas* codifies salicylate hydroxylase as a mechanism to evade the plants defenses (Aritua *et al.*, 2013). Mora-Aguilera *et al.*, 2014, indicate that HLB control must consider the vulnerability of the citrus species and the load of the inoculant. Understanding the enzymatic behavior of trees infected with *CaLas* in different species could help develop alternatives for the protection or defense of the plant. This study was developed with the objective of determining differences in the antioxidant enzyme activity and the concentration of phenols in three citrus species in Bustamante, Tamaulipas, Mexico.

Samples were taken in Felipe Angeles, Bustamante, Tamaulipas, Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) and sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) aged 10 to 12 years were sampled under rainfed conditions, in the phenological stage of fruit set. Samples were taken from two trees with symptoms per species, and one without symptoms. The material was gathered in each one of the cardinal points of the tree (north, south, east, and west), three repetitions of five leaves were taken from each point and kept in liquid nitrogen.

For DNA extraction, the technique quoted by Almeyda-León *et al.* (2001) was modified for its use: 100 mg of tissue were ground in

en tres especies de cítricos en Bustamante, Tamaulipas, México.

Las muestras se recolectaron en Felipe Ángeles, Bustamante, Tamaulipas. Se realizó un muestreo dirigido hacia árboles de 10 a 12 años de edad de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka); y naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), bajo condiciones de temporal, en la etapa fenológica de amarre de fruto. Se tomaron muestras de dos árboles con síntomas por especie y uno sin síntomas. El material se recolectó en cada uno de los puntos cardinales del árbol (norte, sur, este y oeste), se tomaron tres repeticiones de cinco hojas por punto; y se conservaron en nitrógeno líquido.

Para la extracción de ADN se usó la técnica citada por Almeyda-León *et al.* (2001) modificada: se trituraron 100 mg de tejido en nitrógeno líquido, se adicionó 1 mL de solución de extracción 2 ME/CTAB precalentado a 65 °C. Se mezcló en vortex por 30 seg y se incubó a 65 °C por 45 min. Se agregó 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se agitó la mezcla por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se repitió ciclo de centrifugado. Se recuperó la fase superior y se añadió 0.6 volumen de isopropanol para precipitar el ADN a -20 °C durante 24 h. Se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min, se lavó la pastilla con etanol al 70 %, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µL de agua inyectable (Pisa). La presencia de la bacteria se determinó de acuerdo al protocolo de SENASICA-SAGARPA, (2010), usado en la Estación Nacional de Epidemiología y Saneamiento Vegetal (SENASICA-ENECUSaV); en el estado de Querétaro, México.

El extracto crudo para cuantificación de proteínas totales, fenilalanina amonio liasa, peroxidasa y  $\alpha$ -amilasa, se tomó de Díaz *et al.* (2010), modificado:

liquid nitrogen, 1 mL was added of 2 ME/CTAB extraction solution, preheated at 65 °C. It was mixed in a vortex for 30 sec and incubated at 65 °C for 45 min. Next, 500 µL of isoamyl alcohol chloroform was added 24:1, the mixture was stirred inversely and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The aqueous phase was extracted and an equal volume of isoamyl alcohol chloroform was added 24:1; the centrifuge cycle was repeated. The top layer was taken and 0.6 volume of isopropanol was added to precipitate the DNA at -20 °C for 24 h. It was centrifuged at 12,000 rpm for 20 min, the pellet was washed with ethanol at 70 %, centrifuged at 12,000 rpm for 15 min, left to dry and resuspended in 50 µL injectable water (Pisa). The presence of bacteria was determined according to the protocol by SENASICA-SAGARPA, (2010) used in the National Plant Epidemiology and Health Station (SENASICA-ENECUSaV), in the state of Querétaro, Mexico.

The raw extract for the quantification of total proteins, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, and  $\alpha$ -amylase, was taken from Díaz *et al.* (2010), and modified: 1 g of grinded sample was placed in liquid nitrogen, in a sodium phosphate buffer solution 100 mM, pH 7. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 20 minutes at a temperature of 4 °C; later, the supernatant was collected and stored at -20 °C. For the extraction of phenols, methodology B, used by Kähkönen *et al.* (1999) was used here with some modifications; 250 mg of the grinded sample were placed in a 2 mL eppendorf tube and 1 mL of methanol at 80 % was added; it was shaken in a vortex for one minute and centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. The supernatant was collected in a 1.5 mL amber eppendorf tube. It was re-extracted with 500 µL of absolute methanol, repeating the process and stored at -20 °C until use.

Protein concentration was determined according to the technique by Bradford (1976), which

se colocó 1 g de muestra macerada en nitrógeno líquido, en una solución tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C, posteriormente se colectó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C. Para la extracción de fenoles se utilizó la metodología B usada por Kähkönen *et al.* (1999) con algunas modificaciones; se colocaron 250 mg de la muestra macerada en un tubo eppendorf de 2 mL y se agregó 1 mL de metanol al 80 %, se agitó en vortex por un minuto, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf ámbar de 1.5 mL. Se re extrajo con 500 µL de metanol absoluto, repitiendo el proceso; y se conservó a -20 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó según la técnica de Bradford (1976), la cual consistió en mezclar 1 mL de reactivo de Bradford con 100 µL de extracto crudo. Los valores de absorbancia de proteínas totales se determinaron a una  $\lambda=595$  nm en un thermo spectronic Biomate 3. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas por mg de tejido fresco. La curva patrón se obtuvo con albúmina de suero bovino según García y Vázquez (1998).

La determinación de la actividad fenilalanina amonio-liasas (PAL) se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Rodríguez-Pedroso *et al.*, (2006). Se usó como referencia el coeficiente de extinción molar de  $0.0174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para calcular la actividad enzimática (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

La actividad peroxidasa se determinó mediante la metodología usada por Ruttimann *et al.*, (1992). La actividad de la enzima se expresó como milimoles de rojo de fenol oxidado por gramo de tejido fresco por minuto (Yedidia *et al.*, 1999).

Para la cuantificación de  $\alpha$  amilasa se utilizó el protocolo de SIGMA-ALDRICH, (2015). La curva patrón se realizó con varias concentraciones de

consistió en mixing 1 mL of Bradford reagent with 100 µL of raw extract. The total protein absorbance values were determined at a  $\lambda=595$  nm in a thermo spectronic Biomate 3. The protein content was expressed in mg of protein per mg of fresh tissue. The pattern curve was obtained with the albumen of cow serum, as per García and Vázquez (1998).

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity was determined according to the technique described by Rodríguez-Pedroso *et al.*, (2006). The  $0.0174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  molar extinction coefficient was used as a reference to calculate enzyme activity (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

Peroxidase activity was determined using the methodology used by Ruttimann *et al.*, (1992). Enzyme activity was expressed as millimoles of phenol red oxidized per gram of fresh tissue per minute (Yedidia *et al.*, 1999).

For the quantification of  $\alpha$  amylase, we used the SIGMA-ALDRICH protocol, (2015). The standard curve was produced with various concentrations of maltose. The  $\alpha$  amylase activity was defined as  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  of maltose released per  $\mu\text{g}$  of protein (Menéndez *et al.*, 2006).

The content of phenols was determined with the Folin-Ciocalteu method (Singleton *et al.*, 1999). A mixture was prepared using 200 µL of the methanolic extract, 100 µL Folin-Ciocalteu reagent, and 200 µL of sodium carbonate at 20 %. It was shaken and left to rest for 30 min. After this time, total phenol absorbance was measured at one  $\lambda=760$  nm. A standard curve was produced with various concentrations of gallic acid.

The SAS 9.0 statistical package was used to perform an analysis of contrasts between the trees with positive and negative diagnoses for CaLas. The variables analyzed were: total proteins, PAL, POD,  $\alpha$ -amylase, and total phenols.

The sampled trees with symptoms displayed a general yellowness of the canopy and they appeared

maltosa. La actividad  $\alpha$  amilasa se definió como  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de maltosa liberados por  $\mu\text{g}$  de proteína (Menéndez *et al.*, 2006).

El contenido de fenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Se preparó una mezcla con 200  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico, 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu; y 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 20 %. Se agitó y se dejó reposar durante 30 min. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de fenoles totales a una  $\lambda=760$  nm. Se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de ácido gálico.

Se utilizó el programa estadístico SAS ver. 9.0 para realizar un análisis de contrastes entre los árboles con diagnóstico positivo y negativo a *CaLas*. Las variables analizadas fueron: proteínas totales, PAL, POD,  $\alpha$ -amilasa; y fenoles totales.

Los árboles con síntomas muestreados presentaron un amarillamiento general de la copa y apariencia deshidratada; en las hojas se observaron moteados asimétricos menos visibles. Las muestras sintomáticas fueron positivas a *CaLas* y las muestras asintomáticas fueron negativas. Para la detección de *CaLam* todas las muestras fueron negativas.

El análisis de contrastes entre árboles positivos y negativos mostró diferencias significativas entre especies ( $P<0.0001$ ). La concentración de proteínas para limón mexicano mostró una media de 6.1 mg de proteínas por g de tejido fresco para árboles infectados, mientras que para negativos fue 5.46 mg de proteínas por g de tejido fresco con una significancia de  $P=0.0238$ . En naranja dulce hay una diferencia significativa de  $P=0.0002$  con una media de 5.27 y 6.37 mg de proteínas por g de tejido fresco en árboles positivos y negativos respectivamente (Cuadro 1; Figura 1). La determinación de proteínas totales en la planta permite detectar cambios ocasionados por diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Casado, 2004), tal como se muestra en este estudio al encontrar diferencias en

dehidratados; leaves presented asymmetric, less visible spots. Symptomatic samples were positive for *CaLas*, and asymptomatic samples were negative. For the detection of *CaLam* all samples were negative.

The analysis of contrasts between positive and negative trees displayed significant differences between species ( $P<0.0001$ ). Protein concentration for Mexican lime displayed an average of 6.1 mg of proteins per g of fresh tissue for infected trees, whereas for negative ones, it was 5.46 mg of proteins per g of fresh tissue with a significance of  $P=0.0238$ . In sweet orange, there is a significant difference of  $P=0.0002$  with an average of 5.27 and 6.37 mg of proteins per g of fresh tissue in positive and negative trees, respectively (Table 1; Figure 1). Determining total proteins in the plant helps find changes caused by different types of biotic and abiotic stress (Casado, 2004), as shown in this study when finding differences in the concentration of proteins between positive and negative trees for *CaLas*.

Determining PAL did not display significant differences between species, although a higher concentration of PAL was observed in Persian lime and Mexican lime (21.75, 16.09 U $\cdot\text{mg}$  of protein $^{-1}$ ) for negative trees. In contrast, sweet orange trees infected by *CaLas* showed a higher concentration (17.98 U $\cdot\text{mg}$  of protein $^{-1}$ ) (Table 1; Figure 1). The results of this study coincided with Chenyang *et al.* (2001), who mention that the enzyme activity of PAL is modified by biotic and abiotic factors in the plant, since despite having no significant differences, a higher PAL concentration was observed in sweet oranges affected by HLB. The results in Persian and Mexican lime coincided with Martinelli *et al.* (2016), who point out that the regulation of PAL dropped due to the infection of *CaLas* in both species, one considered moderately tolerant, Volkameriana lime (*Citrus*  $\times$

**Cuadro 1. Análisis de contrastes entre árboles con diagnóstico negativo y positivo a *Ca. Liberibacter asiaticus* en el estado de Tamaulipas.**  
**Table 1. Analysis of contrasts between trees with negative and positive diagnoses for *Ca. Liberibacter asiaticus* in the state of Tamaulipas.**

Variables	Especies	Media + Desviación estándar de árboles positivos	Media + Desviación estándar de árboles negativos	ANOVA	
				F	Pr > F
Proteínas totales (PT)	Tres especies	5.7 ± 1.1	5.69 ± 0.8	9.81	<.0001
	Limón persa	5.72 ± 1.06	5.25 ± 0.45	2.74	0.1010
	Limón mexicano	6.1 ± 1.25	5.46 ± 0.73	5.29	0.0238
	Naranja dulce	5.27 ± 0.78	6.37 ± 0.59	15.03	0.0002
Fenilalanina amonio liasa (PAL)	Tres especies	17.40 ± 4.4	18.09 ± 5.3	2.09	0.0620
	Limón persa	19.17 ± 4.04	21.75 ± 3.6	3.10	0.0816
	Limón mexicano	15.05 ± 3.69	16.09 ± 3.45	0.50	0.4809
	Naranja dulce	17.98 ± 4.54	16.44 ± 6.49	1.11	0.2946
Peroxidasas (POD)	Tres especies	1.27 ± 1.4	1.82 ± 1.7	1.05	0.3979
	Limón persa	0.82 ± 0.60	1.96 ± 1.75	4.63	0.0341
	Limón mexicano	1.2 ± 0.8	1.53 ± 1.33	0.38	0.5371
	Naranja dulce	1.79 ± 2.19	1.96 ± 1.93	0.11	0.7373
α amilasa	Tres especies	1.08 ± 0.4	0.94 ± 0.4	6.36	<.0001
	Limón persa	1.26 ± 0.53	1.31 ± 0.39	0.14	0.7064
	Limón mexicano	0.79 ± 0.24	0.99 ± 0.21	2.87	0.0935
	Naranja dulce	1.19 ± 0.34	0.56 ± 0.6	30.27	<.0001
Fenoles totales	Tres especies	19.38 ± 5.4	20.75 ± 4.6	0.89	0.5045
	Limón persa	18.58 ± 5.36	20.43 ± 5.17	0.99	0.3233
	Limón mexicano	18.72 ± 5.9	20.71 ± 4.24	1.14	0.2889
	Naranja dulce	20.84 ± 4.73	21.10 ± 4.79	0.02	0.8887

la concentración de proteínas entre árboles positivos y negativos a *CaLas*.

La determinación de PAL no mostró diferencias significativas entre especies, sin embargo se observó mayor concentración de PAL en limón persa y limón mexicano (21.75, 16.09 U·mg de proteína<sup>-1</sup>), para árboles negativos; por el contrario naranja dulce presentó mayor concentración en los infectados por *CaLas* (17.98 U·mg de proteína<sup>-1</sup>) (Cuadro 1; Figura 1). Los resultados de éste estudio coinciden con Chenyang *et al.* (2001) quienes mencionan que

*volkameriana*), and the other, Navel orange, highly vulnerable.

The levels of peroxidase activity presented a significant difference for Persian lime (P=0.0341). A higher concentration of the enzyme was observed in trees not infected with *CaLas* with averages of 1.96 U·mg of protein<sup>-1</sup> for Persian lime and sweet orange, and for Mexican lime, 1.53 U·mg of protein<sup>-1</sup> (Table 1; Figure 1). In this investigation, we observed a higher enzyme peroxidase activity in negative citrus trees; however, symptoms

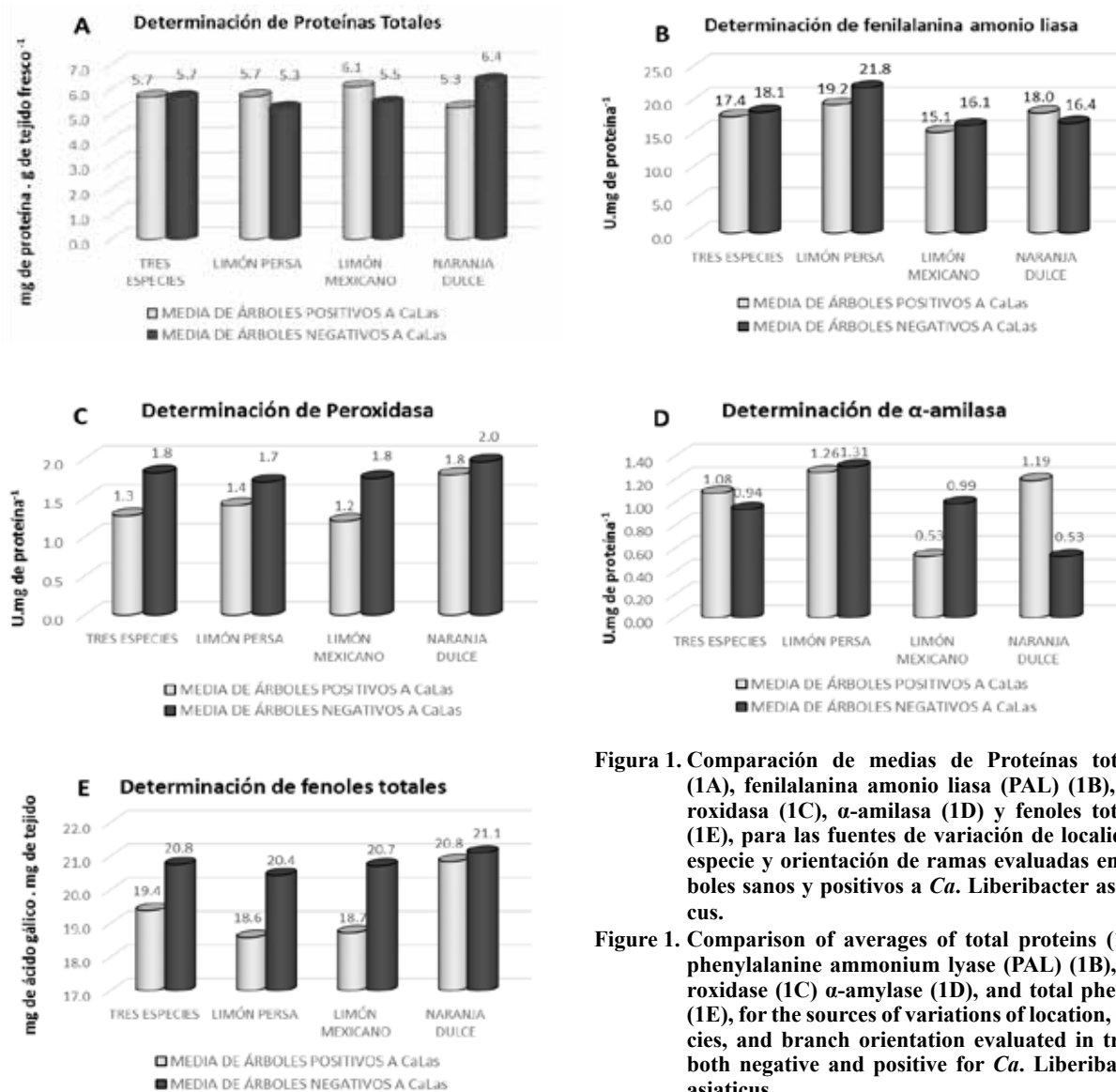


Figura 1. Comparación de medias de Proteínas totales (1A), fenilalanina amonio liasa (PAL) (1B), peroxidasa (1C),  $\alpha$ -amilasa (1D) y fenoles totales (1E), para las fuentes de variación de localidad, especie y orientación de ramas evaluadas en árboles sanos y positivos a *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Figure 1. Comparison of averages of total proteins (1A), phenylalanine ammonium lyase (PAL) (1B), peroxidase (1C)  $\alpha$ -amylase (1D), and total phenols (1E), for the sources of variations of location, species, and branch orientation evaluated in trees, both negative and positive for *Ca. Liberibacter asiaticus*.

la actividad enzimática de la PAL es modificada por factores bióticos y abióticos en la planta; ya que a pesar de no tener diferencias significativas se pudo observar mayor concentración de PAL en naranja dulce afectada por HLB. Los resultados en limón persa y mexicano coinciden con lo señalado por Martinelli *et al.* (2016) quienes indican que la regulación de la PAL disminuyó a causa de la infección de *CaLas* en dos especies de cítricos, una

of central and secondary veins degeneration in leaves leaves infected with HLB, produced by the induced lignification by this enzyme, as mentioned Robinson (1991).

In the enzyme quantification of  $\alpha$ -amylase, significant differences were presented between species and between positive and negative sweet orange trees ( $P < 0.0001$ ). Negative Persian lime and Mexican lime trees displayed a higher



considerada moderadamente tolerante, limón Volkameriana (*Citrus × volkameriana*); y la otra altamente susceptible, naranja Navel.

Los niveles de actividad peroxidasa presentaron diferencia significativa para limón persa ( $P=0.0341$ ). Se observó mayor concentración de la enzima en árboles no infectados con *CaLas* con medias de 1.96 U·mg de proteína<sup>-1</sup> para limón persa y naranja dulce, y para limón mexicano de 1.53, U·mg de proteína<sup>-1</sup> (Cuadro 1; Figura 1). En la presente investigación se observó mayor actividad enzimática de la peroxidasa de los cítricos en árboles negativos; no obstante, se observaron síntomas de acorchamiento de nervaduras centrales y secundarias de las hojas infectadas con HLB, producto de la lignificación inducida por ésta enzima como menciona Robinson (1991).

En la cuantificación enzimática de  $\alpha$ -amilasa se presentaron diferencias significativas entre especies y entre árboles positivos y negativos de naranja dulce ( $P<0.0001$ ). En árboles negativos de limón persa y limón mexicano se observó mayor concentración de  $\alpha$ -amilasa (1.31, 0.99 U·mg de proteína<sup>-1</sup>), respectivamente; en árboles positivos la mayor concentración se detectó en limón persa (1.26 U·mg de proteína<sup>-1</sup>) (Cuadro 1; Figura 1). En el estudio de Martinelli *et al.* (2016), la  $\alpha$ -amilasa se expresó en limón Volkameriana (*Citrus × volkameriana*), señalada como moderadamente tolerante, y la  $\beta$ -amilasa en naranja Navel, material altamente susceptible. En el presente estudio, el estrés ocasionado al árbol provocó que la actividad  $\alpha$ -amilasa aumentara en limón persa seguido por naranja dulce.

Los niveles de concentración de fenoles totales se presentaron en un rango mínimo de 18.5 mg de ácido gálico por g de peso fresco registrado para las muestras infectadas con *CaLas* de limón persa.

concentración de  $\alpha$ -amilasa (1.31, 0.99 U·mg of protein<sup>-1</sup>), respectively; in positive trees, the highest concentration was found in Persian lime (1.26 U·mg of protein<sup>-1</sup>) (Table 1; Figure 1). In the study by Martinelli *et al.* (2016),  $\alpha$ -amylase was expressed in Volkameriana lime (*Citrus × volkameriana*), indicated as moderately tolerant, and  $\beta$ -amylase in Navel orange, a highly vulnerable material. In this study, the stress on the tree caused the  $\alpha$ -amylase activity to increase in Persian lime, followed by sweet orange.

The levels of total phenols were displayed in a minimum range of 18.5 mg of gallic acid per g of fresh weight registered for the samples of Persian lime infected with *CaLas*. Sweet orange presented the maximum value (21.10 mg of gallic acid per g of fresh weight) in negative trees. In the analysis of contrasts, the determination of total phenols did not show significant differences between species ( $P=0.5045$ ) (Table 1; Figure 1). Coinciding with Yedidia *et al.* (1999), who point out that when suppressing the peroxidase activity, the production of phenolic compounds is also reduced, the results do not display a significant difference in peroxidase activity or in phenol compounds.

## CONCLUSIONS

The study showed a higher concentration of proteins in Mexican lime with *CaLas*, and sweet orange in the negative ones. There was a higher PAL enzyme activity in sweet orange tested positive for *CaLas* than in negative trees. The activity of the enzyme peroxidase was not perceivable in this stage of the disease, as was the case for the concentration of total phenolic compounds. The activity of  $\alpha$ -amylase was higher in Persian lime.

Naranja dulce presentó el valor máximo, 21.10 mg de ácido gálico por g de peso fresco, en árboles negativos. En el análisis de contrastes la determinación de fenoles totales no se observaron diferencias significativas entre especies ( $P=0.5045$ ) (Cuadro 1; Figura 1). Coincidiendo con Yedidia *et al.*, 1999, quienes señalan que al reprimirse la actividad de la peroxidasa, también disminuye la producción de compuestos fenólicos, los resultados no muestran una diferencia significativa en la actividad peroxidasa, ni en compuestos fenoles.

## CONCLUSIONES

El estudio mostró mayor concentración de proteínas en limón mexicano con *CaLas*, y naranja dulce en los negativos. Se observó mayor actividad enzimática PAL en naranja dulce positiva a *CaLas* que en los árboles negativos. La actividad de la enzima peroxidasa no fue perceptible en esta etapa de la enfermedad, al igual que la concentración de compuestos fenólicos totales. La actividad  $\alpha$ -amilasa fue mayor en limón persa.

## AGRADECIMIENTOS

A la UAAAN y al programa de becas de CONACYT por el financiamiento otorgado. Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas por el apoyo logístico brindado.

## LITERATURA CITADA

- Albrecht U. and 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 Science*. 175: 291-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.001>
- Almaro, M. F., Ocampo C. y Montes de G. V. 1994. Establecimiento de un método para la determinación de la actividad enzimática de L Fenilalanina amonio liasa (PAL)

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the UAAAN and the CONACYT scholarship program for the funds granted. To the Tamaulipas State Plant Health Committee for the logistical support provided.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- en Cafeto. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. 19 (72): 137-140. [http://www.accefyn.org.co/revista/Vol\\_19/72/137-140.pdf](http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_19/72/137-140.pdf)
- Almeyda-León. I. H., Rocha-Peña. M. A., Piña-Razo. J. and Martínez-Soriano. J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:1-9. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219101.pdf>
- Arfaoui A., El Hadrami A., Mabrouk Y., *et al.* 2007. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* sp. *Ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45 (6-7): 470-479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.004>
- 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: 10.1371/journal.pone.0073742
- Ballester A. R., Lafuente M. T., González-Candelas L. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit- *Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology* 39: 115-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.002>
- Bernal L., Martínez B. E. 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*. 7(25): 77-90. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34202506>
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1/2): 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Casado V. J. 2004. Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.): implicación de polifenol oxidase (PPO) y enzimas antioxidantes. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante. P-113 <http://hdl.handle.net/10045/9919>
- Chenyang H., Hsiang T., Wolyn D. 2001. Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *European Journal of Plant Pathology* 107:473-483. <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1011218304331>
- Christopoulos M. V. and Tsantili E. 2015. Participation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in increased phenolic compounds in fresh col stressed walnut. (*Juglans regia* L.)

- Kernels. *Postharvest Biology and Technology* 104: 17-25 <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.03.003>
- Díaz M., Pérez Y., Cazaña Y., Prieto M., Wencomo H. y Lugo Y. 2010. Determinación de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos de *Morus alba*. *Pastos y Forrajes* 3 (3) <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v33n3/pyf06310.pdf>
- DGSV-Senasica y Mora-Aguilera G. 2012. Ficha técnica HLB Huanglongbing. 31 p. <http://senasica.gob.mx/?id=4612>
- Etcheberria E., Gonzalez P., Achor D. and Albrigo G. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74: 75-83 DOI:10.1016/j.pmp.2009.09.004
- Flores-Sánchez J. L., Mora-Aguilera G., Loeza-Kuk E, López-Arroyo. J. I., Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez. G. y Robles-García P. 2015. Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Folimonova S. Y., Robertson C. J., Gansey S. M, Gowda S. and Dawson O. 2009. Examination of the responses of different genotype of citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology*. 99 (12):1346-1354. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf-plus/10.1094/PHYTO-99-12-1346>
- García A. H. y Vázquez D. R. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bitácora. Biotecnología* 3: 77-88. [www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_1998\\_2/bitacora.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_1998_2/bitacora.pdf)
- Kähkönen, M.P., Hopia A. I., Heikki J. V., Jussi P. R., Pihlaja K., Kujala T. S., and Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3954-3962 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9901461>
- 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 <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0050>
- Koh E-J., Zhou L., Williams D. S., Park J., Ding N., Duam J-P. and 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. DOI: 10.1007/s00709-011-0312-3
- Lozoya S. H., Rivera H. R. y Colinas-León. M. T. 2007. Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia* 41: 479-489 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2284649>
- Lu L., Wang J., Zhu R., Lu H., Zheng X. and Yu T. 2015. Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum* mediated signalling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chemistry*. 172: 603-612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.097>
- Martinelli F., Reagan R. L., Dolan D., Fileccia V. and Dandekar A. M. 2016. Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huanglongbing disease. *BMC Plant Biology* 16:167 DOI 10.1186/s12870-016-0858-5
- Menéndez A. O., Evangelista L. S., Arenas O. M., Bermúdez T. K., Del Villar M. A., Jiménez A. A. 2006. Cambios en la actividad de  $\alpha$ -amilasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Var. Flavicarpa Degener). *Interciencia*. 31(10): 728-733. ISSN 0378-1844
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez G., Domínguez-Monge S., Gutiérrez-Espinosa A., Loeza-Kuk E., González-Gómez R. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 32(2): 108-119. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61243856003>
- Paz-Lago. D., Cabrera G., Ramírez M., Pombo R. y Gutiérrez A. 1999. Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum* f.sp. *licopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales* 20:59-66. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=ctrop.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000790>
- Robinson, D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: Fox P. F. (ed). *Food Enzymology*. Vol. 1. Elsevier, London. pp: 399-426.
- Rodríguez-Pedroso A. T., Ramírez-Arrebato M. A., Cárdenas-Traviésio R. M., Falcón-Rodríguez A., Bautista-Baños S. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza Sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24, 1; 1-7. [https://www.researchgate.net/profile/Silvia\\_Bautista-Banos/publication/237037513\\_Efecto\\_de\\_la\\_Quitosana\\_en\\_la\\_Induccion\\_de\\_la\\_Actividad\\_de\\_Enzimas\\_Relacionadas\\_con\\_la\\_Defensa\\_y\\_Proteccion\\_de\\_Plantulas\\_de\\_Arroz\\_Oryza\\_sativa\\_L\\_contra\\_Pyricularia\\_grisea\\_Sacc/links/0deec51b2975c15955000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Bautista-Banos/publication/237037513_Efecto_de_la_Quitosana_en_la_Induccion_de_la_Actividad_de_Enzimas_Relacionadas_con_la_Defensa_y_Proteccion_de_Plantulas_de_Arroz_Oryza_sativa_L_contra_Pyricularia_grisea_Sacc/links/0deec51b2975c15955000000.pdf)
- Rüttimann, C., E. Schwember, L. Salas, D. Cullen, and R. Vicuna. 1992. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia breviospora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 16:64–76.
- Senasica-Sagarpa. 2010. Protocolo de diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Dirección General de Sanidad Vegetal.
- SIGMA-ALDRICH. 2015 <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/enzymaticassayofamylase.printerview.html>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178 [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Trotel-Aziz. P., Couderchet M., Biagiatti S. and Aziz A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. 64: 21-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>
- Wang C.Y. 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilling zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology* 1: 33-45. doi:10.1016/0925-5214(94)00020-S

Zhong Y., Cheng C. Z., Jiang N. H., Jiang B., Zhang Y. Y., Wu B., Hu M. L., Zeng J. W., Yan H. X., Yi G. J., Zhong G. Y. 2015. Comparative transcriptome and iTraq proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. PLoS ONE. 10(6):e0126973. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126973>