

Identificación de proteínas de unión al ácido salicílico en el transcriptoma de *Citrus latifolia* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Ricardo Santillán-Mendoza, ¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CIR Golfo Centro. Campo Experimental Ixtacuaco. Km. 4.5 carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, CP. 93650, Tlapacoyan, Veracruz, México; **Erick Daniel Rodríguez-Peralta**, ²Tecnológico Nacional de México. Campus Úrsulo Galván. A El Paraíso S/N, Campeste, CP. 91667, Úrsulo Galván, Veracruz, México; **Humberto José Estrella-Maldonado**¹, **Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera**¹, **Cristian Matilde-Hernández**¹, **Jacel Adame-García**², **Nelly Abigail González-Oviedo**, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, CP. 97205, Mérida, Yucatán, México; **Felipe Roberto Flores-de la Rosa**^{1*}.

*Autor de correspondencia: flores.felipe@inifap.gob.mx.

Recibido: Junio 02, 2022.

Aceptado: Noviembre 05, 2022.

Santillán-Mendoza R, Rodríguez-Peralta ED, Estrella-Maldonado HJ, Rodríguez-Quibrera CG, Matilde-Hernández C, Adame-García J, González-Oviedo NA and Flores-de la Rosa FR. 2022. Identificación de proteínas de unión al ácido salicílico en el transcriptoma de *Citrus latifolia* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Revista Mexicana de Fitopatología 40(4).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-1>

Resumen. La producción de limón persa (LP) es importante para el estado de Veracruz, México. Sin embargo, se ve afectada por el Huanglongbing (HLB), causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), un patógeno biotrófico obligado. LP presenta un cierto nivel de tolerancia al HLB, por tanto, resulta relevante estudiar su respuesta de defensa mediada por ácido salicílico (SA). Tres genes con capacidad de participar en la ruta de respuesta por SA, conocidos como *NtSABP*, han sido identificados en *Nicotiana tabacum*; sin embargo, se

desconoce la presencia y actividad de dichos genes en LP en respuesta al HLB. En este trabajo se identificaron proteínas homólogas tipo SABP en el transcriptoma de LP y se determinó su grado de expresión diferencial durante la infección con CLas. Se realizó un tBLASTn en el transcriptoma de LP usando como modelo secuencias de las proteínas SABP de cinco diferentes especies, incluyendo *N. tabacum*. Se reconstruyó y comparó el modelo 3D de las proteínas SABP de *N. tabacum* y *C. latifolia*. Con los análisis de tBLASTn, la reconstrucción filogenética y la estructura tridimensional se logró identificar el homólogo directo de cada gen *NtSABP* en LP. Interesantemente, los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* mostraron represión en plantas infectadas con CLas. En LP hay al menos un homólogo para cada gen *NtSABP*. Durante la infección por CLas, estos genes se encuentran ligeramente reprimidos.

Palabras clave: Limón persa, Huanglongbing, Respuesta molecular.

El limón persa (*Citrus latifolia*) es uno de los cítricos de mayor importancia económica en México, especialmente para el estado de Veracruz, el cual es el principal exportador de este fruto a nivel internacional (Fernández-Lambert *et al.*, 2015). Sin embargo, en años recientes se ha reportado la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), como agente causal del HLB en las principales zonas productoras de limón persa en Veracruz (Rodríguez-Quibrera y Mendoza-Herrera, 2014; Rodríguez-Quibrera *et al.*, 2019). Esto resulta de gran importancia, debido a que la enfermedad es considerada la más destructiva para la citricultura mundial (Mora-Aguilera *et al.*, 2014).

Se ha documentado que las diferentes especies de cítricos tienen una respuesta diferencial ante la infección con CLas. Por ejemplo, las especies de cítricos ácidos, como el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), presentan un mayor nivel de tolerancia al HLB respecto a aquellos considerados dulces, como la naranja, la mandarina o la toronja (McCollum *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2021). Evidencia empírica sugiere que el nivel de tolerancia que el limón persa muestra ante la infección por CLas también es mayor que en las especies de cítricos dulces, sin embargo, algunas afectaciones fisiológicas como la acumulación de almidón y baja concentración de clorofila total siguen ocurriendo (Flores-de la Rosa *et al.*, 2021). Por lo anterior, resulta muy importante comprender la respuesta molecular del limón persa ante la infección.

La principal ruta de defensa que las plantas tienen ante organismos biotróficos, tal como CLas, es la mediada por ácido salicílico (SA) (Gao *et al.*, 2015). Esta ruta activa numerosas respuestas moleculares en la planta, la mayoría de ellas como resultado de la sobreexpresión del gen *NPR1* (Nonexpressor of Pathogenesis-related protein 1) (Backer *et al.*, 2019). El SA interactúa directamente con *NPR1* al modificar el potencial redox en el citoplas-

ma, lo que ocasiona la monomerización de *NPR1* y su posterior ingreso al núcleo celular (Zhang *et al.*, 2019) y también uniéndose directamente a *NPR1* (Wu *et al.*, 2012). Para la infección de CLas en cítricos, se ha determinado que la señalización por SA es interrumpida por ese patógeno, debido a la presencia de una enzima salicilato hidroxilasa funcional que limita la movilización del SA al metabolizarlo y suprimir las defensas de la planta (Li *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha observado que la aplicación exógena de concentraciones altas de SA en cítricos enfermos de HLB coadyuva a que la planta mantenga las respuestas de defensa y la expresión de genes antioxidantes durante la infección (Flores-de la Rosa *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). Asimismo, se ha reportado que la inserción y la sobreexpresión del gen *AtNPR1* en cítricos susceptibles genera un mayor grado de tolerancia al HLB en comparación a genotipos silvestres (Dutt *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2020), lo que sugiere el papel fundamental del SA en respuesta a la tolerancia contra el HLB.

A pesar de su papel importante en la respuesta al estrés biótico, plantas mutantes Δ *NPR1* siguen presentando reacciones de defensa mediadas por SA, lo que indica que *NPR1* y sus parálogos no son los únicos genes relacionados con la unión al SA (Backer *et al.*, 2019; Pokotylo *et al.*, 2019). En tabaco (*Nicotiana tabacum*), se han identificado, purificado y caracterizado al menos tres proteínas de unión al SA (SABP), con diferentes niveles de afinidad a esa fitohormona y con actividad durante la respuesta ante patógenos biotróficos (Pokotylo *et al.*, 2019). Asimismo, se han determinado homólogos a los genes *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* en otras plantas como *Arabidopsis thaliana* (Manohar *et al.*, 2015; Pokotylo *et al.*, 2019), sin embargo, a la fecha no existen reportes de genes homólogos en limón persa, ni de su participación durante la infección con CLas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de homólogos a

las proteínas de unión al ácido salicílico (SABP) en el transcriptoma de limón persa y determinar su expresión relativa durante la infección con CLAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material biológico, generación y secuenciación del transcriptoma. El material utilizado en este estudio se obtuvo de una plantación de limón persa comercial de cinco años de edad, infectada naturalmente con CLAs. Se identificaron hojas en etapa de madurez fisiológica V6 de acuerdo con la escala de Ribeiro *et al.* (2021), las cuales presentaban síntomas característicos de HLB. Asimismo, se localizaron árboles sin síntomas aparentes de la enfermedad. Las muestras se obtuvieron en campo e inmediatamente almacenadas en nitrógeno líquido y posteriormente maceradas, tras lo cual se dividió la hoja para extracción de ADN y ARN. Para confirmar si las muestras de los árboles presentaban al patógeno se extrajo ADN con el método CTAB (Rodríguez-Quibrera *et al.*, 2019) y la detección de CLAs se realizó mediante el protocolo de PCR anidada descrito por Lin *et al.* (2010). Además, se corroboró la homogeneidad genética del patógeno mediante cinco regiones microsatélites (datos no mostrados). La descripción de la secuenciación, ensamblado y análisis general del transcriptoma se resumen en Estrella-Maldonado *et al.* (en preparación).

Aislamiento de secuencias de los genes *SABP1*, *SABP2* y *SABP3* a partir de las especies de referencia. Usando como modelo las secuencias de las proteínas SABP1, SABP2 y SABP3 de *Nicotiana tabacum*, se procedió a realizar un análisis tBLASTn contra las bases de datos de proteínas de *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Citrus sinensis*, obtenidas de la base de datos del NCBI. Con las secuencias de aminoácidos de las

cuatro especies, se construyó un archivo por cada gen y se hizo un análisis tBLASTn contra el transcriptoma de limón persa ensamblado. Todas las secuencias de transcritos identificados en el transcriptoma para cada proteína fueron identificadas y utilizadas para los análisis posteriores. Asimismo, se determinó el porcentaje de similitud entre cada secuencia proteica SABP con las secuencias de *N. tabacum* mediante el software MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.*, 2016).

Alineamiento, filogenia y estructura tridimensional de las proteínas SABP de limón persa.

Una vez recuperados los transcritos del transcriptoma ensamblado, se realizó la búsqueda de los marcos de lectura abierto (ORF), de los cuales se utilizó el más grande disponible y fue traducido a proteínas mediante las herramientas disponibles en el servidor del NCBI. Posteriormente, se hizo el alineamiento para cada proteína de las cinco especies, usando el algoritmo Clustal W con las opciones establecidas por default. Posteriormente, se efectuó una reconstrucción filogenética mediante Máxima Parsimonia (1000 bootstrap), tanto el alineamiento como el análisis filogenético fue ejecutado en el software MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.*, 2016). La secuencia de aminoácidos de cada proteína SABP de *N. tabacum* y *C. latifolia* fue utilizada para construir un modelo 3D de la estructura proteica, para lo cual se empleó el software Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) y el resultado fue visualizado en el servidor de EzMol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>).

RESULTADOS

Aislamiento de secuencias y filogenia de SABP. A partir de las secuencias de las proteínas SABP de *N. tabacum*, se identificaron diferentes secuencias

homólogas de las especies *M. polymorpha*, *A. thaliana* y *C. sinensis*. Con estas secuencias se realizó un tBLASTn contra el transcriptoma ensamblado de limón persa, del cual se identificaron transcritos potencialmente homólogos a los genes *NtSABP*. Las secuencias utilizadas por cada gen para cada especie y los transcritos recuperados en el transcriptoma de limón persa se resumen en el Cuadro 1.

Con base en la reconstrucción filogenética, se determinó la relación de homología de los genes *SABP* entre los transcritos de limón persa y las

identificadas en las demás especies evaluadas. Con respecto al gen *NtSABP1* se precisó que el transcrito DN42_c0_g2_i4 es el homólogo correspondiente, por lo cual fue nombrado como *CISABP1* (Figura 1). Para el gen *NtSABP2*, resultó que el transcrito DN10091_c0_g2_i1 es el homólogo directo, por lo cual fue nombrado como *CISABP2* (Figura 2). Por último, para el gen *NtSABP3*, se concluyó que el homólogo es el transcrito DN3559_c0_g1_i1, ahora nombrado como *CISABP3* (Figura 3). La secuencia de los transcritos fue depositada en el Genbank

Cuadro 1. Porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos SABP de *N. tabacum* y secuencias homólogas identificadas en cinco diferentes especies. Se señala con un asterisco la secuencia obtenida de *Citrus latifolia* con mayor porcentaje de identidad con las secuencias de *N. tabacum*.

Especies	<i>N. tabacum</i>		<i>N. tabacum</i>		<i>N. tabacum</i>	
	SABP1 homólogos	SABP1 Catalasa	SABP2 homólogos	SABP2 MeSA esterase	SABP3 Homólogos	SABP3 β-Carbonic anhydrase
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q96528 Catalasa 1	77.73	Q8S8S9 MeSA1	56.75	P27140 β Carbonic anhydrase 1	73.75
	P25819 Catalasa 2	78.36	O80476 MeSA2	52.51	P42737 β Carbonic anhydrase 2	64.85
	Q42547 Catalasa 3	76.47	O80474 MeSA4	51.15		
<i>Marchantia polymorpha</i>	OAE31579.1	74.16	OAE21631.1	33.98	OAE34792.1	45.61
	OAE35247.1	69.95	PTQ33879.1	33.06	PTQ38106.1	44.32
	PTQ30274.1	69.95				
	PTQ30353.1	74.16				
<i>Citrus sinensis</i>	KDO85095.1	75.94	KDO79350.1	57.91	KDO66162.1	76.97
	KDO85096.1	78.99	KDO79351.1	58.68	KDO66164.1	77.12
	XP_006473789.1	77.10	KDO79352.1	58.68	KDO66166.1	76.97
	XP_006473790.1	77.10	NP_001275858.1	58.68	KDO66167.1	76.97
	XP_006473792.1	78.78	XP_006466659.1	58.30	KDO66170.1	76.89
	XP_006473794.1	78.78	XP_006466663.1	59.07	XP_006470326.1	76.97
<i>Citrus latifolia</i>			XP_006485914.1	56.92		
			XP_024957411.1	55.76		
	DN42 c0 g2 i4	77.31*	DN10091 c0 g2 i1	59.07*	DN502 c0 g1 i2	63.92
	DN42 c0 g2 i3	76.21	DN1788 c0 g1 i8	9.31	DN3559 c0 g1 i1	76.02*
			DN1788 c0 g1 i1	9.69		
		DN1788 c0 g1 i9	9.69			

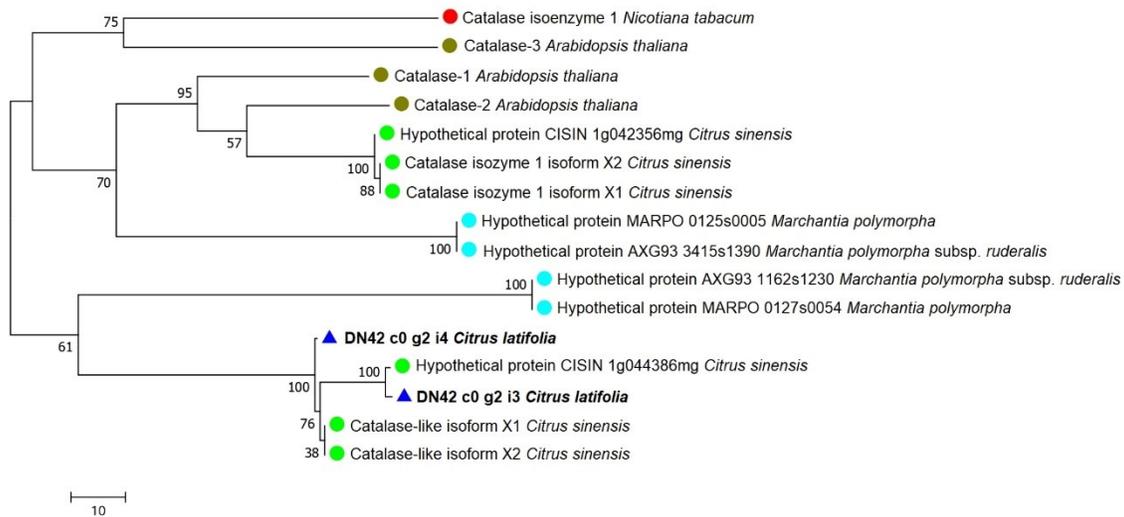


Figura 1. Filogenia basada en Máxima Parsimonia (1000 bootstraps) del resultado de tBLASTn de las secuencias homólogas al gen *SABP1*. Las secuencias de los transcritos recuperados del transcriptoma de limón persa se resaltan en negritas.

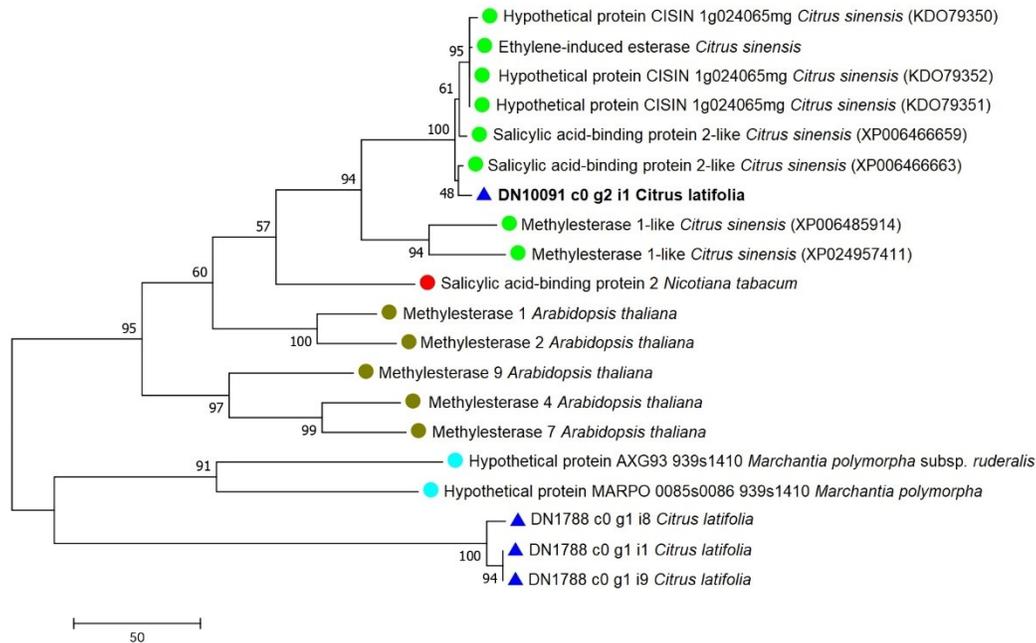


Figura 2. Filogenia basada en Máxima Parsimonia (1000 bootstraps) del resultado de tBLASTn de las secuencias homólogas al gen *SABP2*. Las secuencias de los transcritos recuperados del transcriptoma de limón persa se resaltan en negritas.

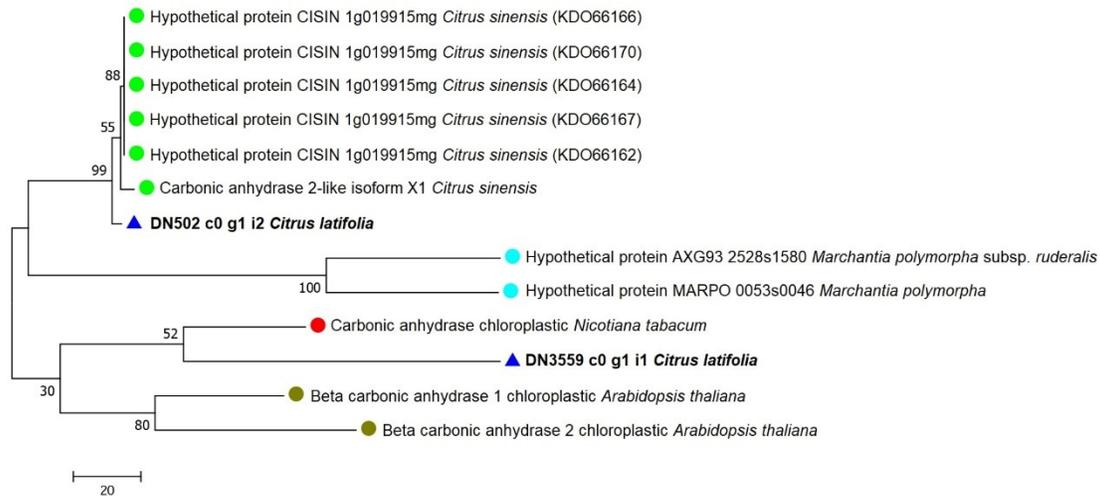


Figura 3. Filogenia basada en Máxima Parsimonia (1000 bootstraps) del resultado de tBLASTn de las secuencias homólogas al gen *SABP3*. Las secuencias de los transcritos recuperados del transcriptoma de limón persa se resaltan en negritas.

del NCBI con los siguientes números de acceso: *CISABP1* (OM719611), *CISABP2* (OM719612) y *CISABP3* (OM719613).

Expresión diferencial de los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* en el transcriptoma de limón persa infectado con CLas. El análisis de expresión DESeq2 mostró que los genes *SABP1*, *SABP2* y *SABP3* reprimen su expresión relativa cuando las plantas están infectadas por CLas; sin embargo, ninguno de los tres genes presenta diferencia estadísticamente significativa (Figura 4). De los tres genes identificados, *CISABP1* y *CISABP2* causaron una mayor represión con valores de tasa de cambio (Fold Change Log2) superiores a -0.5, sin embargo, *CISABP3* indujo una menor represión con una tasa de cambio cercano a -0.3.

Análisis de estructura tridimensional de las proteínas CISABP. Con base en la secuencia de aminoácidos traducidos se reconstruyó el modelo 3D de cada proteína SABP para *N. tabacum* y *C.*

latifolia, los resultados se resumen en la Figura 5. Se puede observar claramente que existe una alta similitud estructural entre las proteínas SABP1 y SABP2 de ambas especies, lo que apoya la hipótesis de que los genes codificantes de las mismas son homólogos. Sin embargo, para la proteína SABP3, la semejanza estructural es menor, aunque se conservan la mayoría de las regiones entre ambas especies. A partir de 457 residuos de la secuencia de la proteína CISABP1, ésta fue modelada con un 100% de confianza como una catalasa, de la cual, 38% de la secuencia formó α -hélices y el 22% integró β -láminas. Para la secuencia CISABP2, 258 residuos fueron modelados al 100% de confianza como perteneciente a la súper familia de las hidrolasas, con un 42% de α -hélices y el 11% formó β -láminas. Por último, la secuencia CISABP3 fue modelada al 100% de confianza considerando 210 residuos y asociada con la súper familia de las β -anhidrasas carbónicas, con 42% de α -hélices y 20% de β -láminas. Los modelos 3D de las tres secuencias proteicas se presentan en la Figura 5.

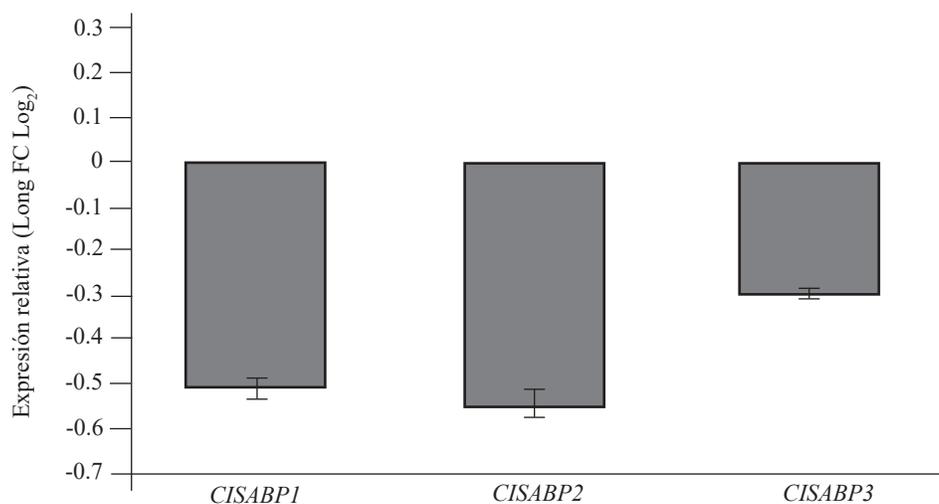


Figura 4. Expresión relativa de los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* en limón persa infectado con CLas en comparación a una planta sana.

DISCUSIÓN

Debido a la naturaleza sésil de las plantas, los mecanismos de respuesta a diferentes fuentes de estrés son muy complejos y recién comienzan a entenderse a profundidad (Zhang *et al.*, 2022). Un caso especial de estos mecanismos de respuesta es la defensa al ataque de organismos causantes de enfermedades, ya que las plantas no cuentan con sistemas inmunes especializados como los animales (Jones y Dangl, 2006). La ruta de respuesta a patógenos mediada por SA ha sido demostrada como la de mayor importancia ante la infección por organismos biotróficos (Yang *et al.*, 2015), sin embargo, estudios recientes han revelado que esta ruta que activa las defensas a través del SA es mucho más compleja de lo que se pensaba (Huang *et al.*, 2020). Esto incluye las proteínas que tienen una posible interacción directa con el SA, tal como son las proteínas SABP (Pokotylo *et al.*, 2019).

Las proteínas SABP han sido identificadas en especies modelos como *N. tabacum* y *A. thaliana* (Pokotylo *et al.*, 2019), sin embargo, poco se

conoce respecto a genes homólogos codificantes de estas proteínas en especies de importancia agrícola, como los cítricos. En el presente trabajo de investigación se identificaron homólogos a los genes *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* en el transcriptoma de limón persa infectado con CLas. Los resultados sugieren que existe al menos un homólogo directo a cada gen presente en este frutal.

El análisis filogenético y la comparación de las estructuras 3D sugieren que el gen nombrado en este trabajo como *CISABP1* tiene una alta homología con *NtSABP1*. Este gen ha sido caracterizado como una catalasa 2 (CAT2) en *A. thaliana* (Chen *et al.*, 1993; Klessin *et al.*, 2018), la cual se relaciona con la respuesta de defensa, ya que a mayor concentración de SA se inhibe la actividad de CAT2, luego se incrementan los niveles de H₂O₂ y se detiene la síntesis de ácido jasmónico y la acumulación de auxinas, lo que a su vez eleva la respuesta de defensa contra patógenos biotróficos, mientras que aumenta la susceptibilidad ante necrotrofos (Yuan *et al.*, 2017). En nuestros resultados, se observó que el gen *CISABP1* mostró una represión de su expresión

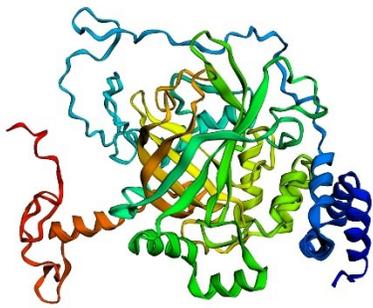
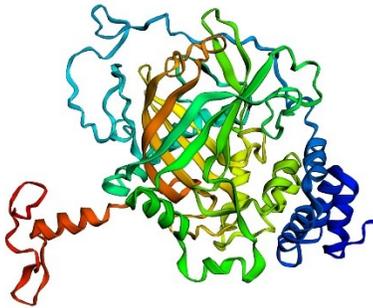
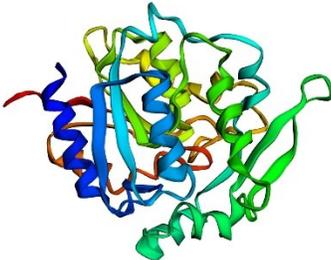
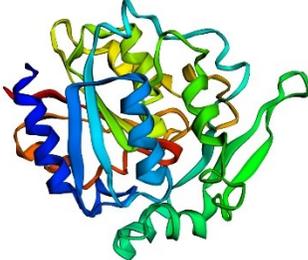
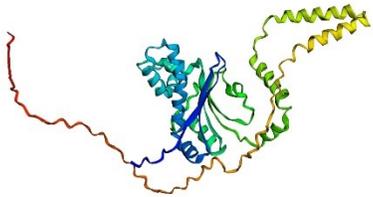
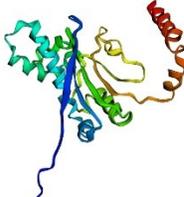
Proteína	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Citrus latifolia</i>
SABP1		
SABP2		
SABP3		

Figura 5. Comparación estructural de los modelos 3D de las proteínas SABP identificadas en el transcriptoma de limón persa respecto a las reportadas en *N. tabacum*.

relativa en plantas de limón persa infectadas con CLas, aunque dicha represión no fue significativa. Ésta podría ser explicada por la capacidad de metabolizar el SA por parte de CLas (Li *et al.*, 2017), lo cual no permite alcanzar los niveles de SA necesarios para ampliar la respuesta de defensa de la planta utilizando la vía CAT2, tal como se ha observado en *A. thaliana* (Yuan *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha encontrado que durante la infección por CLas, los niveles de H₂O₂ se incrementan y la actividad

catalasa es ligeramente reprimida en cítricos (Pitino *et al.*, 2017). Por lo tanto, no es posible determinar si la represión del gen CAT2 (*CISABP1*) es dada por la supresión de CLas o por la respuesta de la planta mediada por SA; no obstante, el gen *CISABP1* podría jugar un papel primordial durante la infección por CLas en limón persa.

Igualmente se observó una alta similitud estructural entre las proteínas SABP2 de *N. tabacum* y *C. latifolia*. Esta proteína ha sido caracterizada como

una metil-salicilato esterasa relacionada con la defensa vegetal, debido a que convierte el metil salicilato en SA (Forouhar *et al.*, 2005). En un estudio reciente, la sobreexpresión de un gen codificante de una carboxil transferasa en *C. sinensis*, demostró conducir a una mayor acumulación de SA y por tanto a la inhibición de los síntomas generados por CLas (Zou *et al.*, 2021). En el presente trabajo de investigación se identificó al gen *CISABP2* como un homólogo directo al gen *NtSABP2*, por lo cual, se puede inferir con base en la homología funcional que es un gen prioritario para el incremento de SA en limón persa. Sin embargo, la represión de la expresión relativa del gen *CISABP2*, sugiere que la infección por CLas inhibe la ruta de respuesta de defensa no solo mediante la metabolización del SA, sino también suprimiendo su biosíntesis a través de la represión de genes como *CISABP2*. Y por ello se necesitan más estudios para determinar el efecto que tiene la expresión del gen *CISABP2* sobre los mecanismos de defensa del limón persa ante la infección por CLas.

Por último, para *CISABP3*, el análisis estructural mostró regiones altamente conservadas en el plegamiento de la proteína, características del gen homólogo, aunque la secuencia proteica codificada por el gen *CISABP3* no presenta una cadena aminoacídica en el C-terminal en *NtSABP3* (Figura 3). Esta proteína ha sido descrita como una anhidrasa carbónica localizada en el cloroplasto, con actividad antioxidante e importante en la respuesta hipersensible (Slaymaker *et al.*, 2002). Se ha corroborado que dicha proteína se acumula en menor medida como resultado de la infección por CLas en *C. paradisi*, lo que podría estar relacionado con la deficiencia en la capacidad fotosintética, pues participa activamente de la fijación de CO₂ (Nwugo *et al.*, 2013). También se ha observado que este gen se reprime en cítricos susceptibles al HLB durante la infección (Mafra *et al.*, 2013), lo que viene a ser de

interés, pues en los resultados encontrados en este trabajo, el gen *CISABP3*, si bien se ve ligeramente reprimido, dicha represión no es significativa respecto a una planta sana, lo cual podría estar relacionado con la mayor tolerancia del limón persa ante la infección por CLas. Además, es importante destacar que el gen *CLIBASIA05315*, presente en el genoma del patógeno, contiene un dominio conservado relacionado con las anhidrasas carbónicas (Flores-de la Rosa *et al.*, 2020), el cual produce una proteína que se une a los cloroplastos durante la infección en *N. benthamiana* y causa muerte celular (Pitino *et al.*, 2016). Por tanto, planteamos la hipótesis de que la similitud de las secuencias de *SABP3* entre *N. tabacum* y *C. latifolia*, podría estar asociada a la semejanza de los síntomas observables en estas dos especies al infectarse con CLas.

El análisis mostrado en el presente trabajo de investigación sienta las bases para profundizar en el estudio de la respuesta de defensa mediada por SA en limón persa contra el HLB, a través de los genes *CISABP*, ya que, al ocurrir una represión de su expresión relativa durante la infección, un análisis funcional de los mismos podría ayudar a comprender por qué el limón persa muestra una respuesta de más tolerancia hacia el HLB en comparación con cítricos dulces.

CONCLUSIONES

El transcriptoma de limón persa sano e infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus* contiene los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3*, homólogos a los genes *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* de *Nicotiana tabacum*, los cuales codifican para proteínas de unión a ácido salicílico.

Los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* se encuentran ligeramente reprimidos en el transcriptoma de plantas de limón persa enfermas de HLB.

Las proteínas CISABP1, CISABP2 y CISABP3 comparten una alta similitud estructural con respecto a NtSABP1, NtSABP2 y NtSABP3 de *N. tabacum*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (COVEICYDET) a través del financiamiento al proyecto “Transcriptómica de limón persa infectado con HLB y caracterización genómica del agente causal, *Candidatus Liberibacter asiaticus*” (número de proyecto: 15 1906/2021). RPED agradece por la beca otorgada para la realización del presente trabajo (número de beca 15 1906/2021-01). Asimismo, se agradece el apoyo técnico de Carlos González Cruz para el análisis de datos.

LITERATURA CITADA

- Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P and Peña L. 2021. Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *Citrus* relatives. *Frontiers in Plant Science* 11:617664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>
- Backer R, Naidoo S and van den Berg N. 2019. The nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1) and Related Family: Mechanistic Insights in Plant Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science* 10:102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00102>
- Chen Z, Silva H and Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262(5141):1883-1885. <https://doi.org/10.1126/science.8266079>
- Dutt M, Barthe G, Irely M and Grosser J. 2015. Transgenic Citrus Expressing an *Arabidopsis* NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *Plos One* 10(9):e0137134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>
- Fernández-Lambert G, Aguilar-Lasserre AA, Martínez-Castellanos G, Ruvalcaba-Sánchez MLG, Correa-Medina JG and Martínez-Flores JL. 2015. Context and characterization of Persian lime supply chain (*Citrus latifolia* Tanaka) of state Veracruz-Mexico. *Conciencia Tecnológica* 50:21-31. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94443423004>
- Flores-de la Rosa FR, Rodríguez-Quibrera CG, Matilde-Hernández C and Santillán-Mendoza R. 2020. Bioinformatic Analysis of Potential Pathogenicity Effectors of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Causal Agent of Citrus Huanglongbing. *American Journal of Plant Science* 11:1319-1330. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.118094>
- Flores-de la Rosa FR, Santillán-Mendoza R, Rodríguez-Quibrera CG, Martínez-Ruiz A, Adame-García J and Luna-Rodríguez M. 2021. Antioxidant gene expression, chlorophyll, and starch content in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka Ex Q. Jiménez) trees with HLB by application of elicitors of plant resistance. *Mexican Journal of Biotechnology* 6(2):86-102. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.2.86>
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Wook-Park S, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Klessig DF and Tong L. 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 102(5):1773-1778. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409227102>
- Gao Z, Li Y, Wu G, Li G, Sun H, Deng S, Shen Y, Chen G, Zhang R, Meng C and Zhang X. 2015. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by Salicylic Acid (SA) and Jasmonic Acid (JA). *Plos One* 10(10):e0140609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140609>
- Huang W, Wang Y, Li X and Zhang Y. 2020. Biosynthesis and regulation of salicylic acid and N-hydroxypipicolinic acid in plant immunity. *Molecular Plant* 13:31-41. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.12.008>
- Jones JDG and Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Klessig DF, Choi HW and Dempsey DMA. 2018. Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Molecular Plant Microbe Interactions* 31(9):871-888. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>
- Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Li J, Pang Z, Trivedi P, Zhou X, Ying X, Jia H and Wang N. 2017. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ encodes a functional Salicylic Acid (SA) hydroxylase that degrades SA to suppress plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 30(8):620-630. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0257-R>
- Li L, Dou N, Zhang H and Wu C. 2021. The versatile GABA in plants. *Plant Signaling and Behavior* 16(3):1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- Lin H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo EL, Bai X and Zhao X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 81(1):17-25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>
- Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J and Machado MA. 2013. *Candidatus Liberibac-*

- ter americanus induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics* 14:247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>
- Manohar M, Tian M, Moreau M, Park SW, Woo-Choi S, Fei Z, Friso G, Asif M, Manosalva P, von Dahl CC, Shi K, Ma S, Dinesh-Kumar SP, O'Doherty I, Schroeder FC, van Wijk KJ and Klessig DF. 2015. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Frontiers in Plant Science* 5:777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00777>
- McCollum G, Hilf M, Irely M, Luo W and Gottwald T. 2016. Susceptibility of sixteen citrus genotypes to 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Plant Disease* 100:1080-1086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0940-RE>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A and Loeza-Kuk E. 2014. Current situation and Prospects for Management of Citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2):108-119. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092014000200108&script=sci_arttext&tlng=en
- Nwugo CC, Duan Y and Lin H. 2013. 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(6):e67442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067442>
- Pitino M, Armstrong CM, Cano LM and Duan Y. 2016. Transient expression of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 7:982. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00982>
- Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H₂O₂ in citrus plants in response to "Candidatus Liberibacter asiaticus" infection. *Horticultural Research* 4:17040. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Pokotylo I, Kravets V and Ruelland E. 2019. Salicylic Acid Binding Proteins (SABPs): The Hidden Forefront of Salicylic Acid Signalling. *International Journal of Molecular Sciences* 20(18):4377. <https://doi.org/10.3390/ijms20184377>
- Qiu W, Soares J, Pang Z, Huang Y, Sun Z, Wang N, Grosser J and Dutt M. 2020. Potential Mechanisms of *AtNPR1* Mediated Resistance against Huanglongbing (HLB) in *Citrus*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(6):2009. <https://doi.org/10.3390/ijms21062009>
- Ribeiro C, Xu J, Teper D, Lee D and Wang N. 2021. The transcriptome landscapes of citrus leaf in different developmental stages. *Plant Molecular Biology* 106(4-5):349-366. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01154-8>
- Rodríguez-Quibrera CG y Mendoza-Herrera A. 2014. Una amenaza para la citricultura mexicana. *La ciencia y el Hombre* 27(1). <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol27num1/contenido.html>
- Rodríguez-Quibrera CG, Flores-de la Rosa FR, López-Sosa CG, Adame-García J y Hernández-Guerra C. 2019. Detección de Clas mediante la evaluación de iniciadores específicos en árboles de limón Persa en Veracruz. Pp:2438-2454. *In: Vinay VJC et al. (eds.). Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático.* INIFAP, CP, UACH, INAPESCA, UV, TecNM. Medellín de Bravo, Ver., México. 3(1). 2488p. <chrome-extension://efaidnbmninnibpcapjpeglclefindmkaj/http://rctveracruz.org/descargarlibro/libros/Bio33.pdf>
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB and Klessig DF. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99(18):11640-11645. <https://doi.org/10.1073/pnas.182427699>
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, de Luca V and Despres C. 2012. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* 1:639-647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>
- Yang L, Li B, Zheng X, Li J, Yang M, Dong X, He GCA and Deng XW. 2015. Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in *Arabidopsis* hybrids. *Nature Communications* 6:7309. <https://doi.org/10.1038/ncomms8309>
- Yuan HM, Liu WC and Lu YT. 2017. CATALASE2 Coordinates SA-Mediated Repression of Both Auxin Accumulation and JA Biosynthesis in Plant Defenses. *Cell Host and Microbe* 21(2):143-155. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.007>
- Zhang D, Zhu Z, Gao J, Zhou X, Zhu S, Wang X, Wang X, Ren G and Kuai B. 2019. The NPR1-WRKY46-WRKY6 signaling cascade mediates probenazole/salicylic acid-elicited leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 63(5):924-936. <https://doi.org/10.1111/jipb.13044>
- Zhang H, Zhu J, Gong Z and Zhu JK. 2022. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics* 23:104-119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- Zou X, Zhao K, Liu Y, Du M, Zheng L, Wang S, Xu L, Peng A, He Y, Long Q and Chen S. 2021. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase (*CsSAMT1*) enhances tolerance to huanglongbing disease in Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *International Journal of Molecular Sciences* 22:2803. <https://doi.org/10.3390/ijms22062803>