



Nota Fitopatológica

Expresión del complejo *RPM1-RIN4-RPS2* en dos especies de cítricos con respuesta contrastante al Huanglongbing

Eric Ángel Mendoza-Pérez, Tecnológico Nacional de México Campus Úrsulo Galván Extensión Tlapacoyan. Calle Prol. Abasolo s/n, C.P. 93650 Tlapacoyan, Ver. México; **Ricardo Santillán-Mendoza, Humberto Estrella-Maldonado, Cristian Matilde-Hernández, Felipe Roberto Flores-de la Rosa***, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental Ixtacuaco. Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Ver. km 4.5. Congregación Rojo Gómez, Tlapacoyan, Veracruz, C.P. 93650, México; **Jacel Adame-García**, Tecnológico Nacional de México Campus Úrsulo Galván. A El Paraíso S/N, Campestre, 91667 Úrsulo Galván, Ver. México.

***Autor de correspondencia:**

Felipe Roberto
Flores-de la Rosa
flores.felipe@
inifap.gob.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
18 Julio, 2023

Aceptado:
19 Febrero, 2024

Publicado:
06 March, 2024

Cita:
Mendoza-Pérez EA,
Santillán-Mendoza R,
Estrella-Maldonado H,
Matilde-Hernández C,
Flores-de la Rosa FR y
Adame-García J. 2024.
Expresión del complejo
RPM1-RIN4-RPS2 en dos
especies de cítricos con
respuesta contrastante al
Huanglongbing.
Revista Mexicana de
Fitopatología 42(2): 15.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2307-6](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2307-6)



RESUMEN

Objetivos/antecedentes. El limón persa (*Citrus latifolia*) muestra un nivel muy alto de tolerancia al Huanglongbing (HLB). Un estudio reciente sugiere que genes del complejo *RPM1-RIN4-RPS2* podrían ser parte de los responsables de la tolerancia al HLB en el limón persa, a diferencia de otras especies muy susceptibles como la naranja (*C. sinensis*). El objetivo del presente trabajo fue comparar la expresión de este complejo génico entre la naranja, altamente susceptible al HLB, y el limón persa, una especie tolerante.

Materiales y Métodos. Se obtuvieron las secuencias de los tres genes del complejo para naranja y limón persa de bases de datos de trabajos previamente publicados, se realizaron alineamientos y diseño de iniciadores para expresión génica mediante diversas herramientas bioinformáticas. Posteriormente, se obtuvieron muestras de tejido de naranja y limón persa con síntomas de HLB y se corroboró la infección. Se realizó la comparación de la expresión de los genes *RPM1-RIN4-RPS2* mediante RT-PCR punto final.

Resultados. Se determinó la presencia de los tres genes del complejo en naranja y limón persa, además, se determinó que están altamente conservados entre ambas especies. Además, se observó que no existe una expresión diferencial para el gen *RPM1* en tejido sintomático de HLB, sin embargo, sí hay diferencia en la expresión de los genes *RPS2* y *RIN4*.

Conclusión. Los resultados sugieren que la respuesta contrastante al HLB podría estar asociada a la actividad de la interacción de los genes *RIN4* y *RPS2*, por lo

cual, esta podría ser de interés para el mejoramiento genético de los cítricos en miras del control del HLB.

Palabras Clave: PTI, ETI, Tolerancia al HLB, Transcriptómica.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la citricultura está sufriendo graves estragos causados por el daño que el Huanglongbing (HLB) genera en todas las especies y variedades de cítricos (Ghosh *et al.*, 2022). El HLB es causado por tres diferentes especies del género *Candidatus Liberibacter* (CL): CL *americanus* (CLam), causando HLB en cultivares de Brasil (Teixeira *et al.*, 2005), CL *africanus* (CLaf), presente en el continente africano (da Graça *et al.*, 2022) y CL *asiaticus* (CLas), la más distribuida a nivel mundial (Ajene *et al.*, 2020), y presente en zonas cítricas de México (Huang *et al.*, 2022).

A pesar de que se considera que todas las especies de cítricos de importancia agrícola son susceptibles a la enfermedad, existe un gradiente de susceptibilidad entre las diferentes especies, siendo principalmente marcada la diferencia entre cítricos ácidos y dulces (McCollum *et al.*, 2016; Gao *et al.* 2023). La naranja Valencia (*C. sinensis*), considerada un cítrico dulce, es uno de los cítricos más importantes en México, tanto en extensión sembrada como en derrama económica (SIAP, 2022); sin embargo, a su vez, es una de las especies más susceptibles al HLB. Numerosos estudios con el uso de herramientas ómicas han demostrado que la infección por CLas ocasiona significativas alteraciones metabólicas, fisiológicas y moleculares en *C. sinensis* (Fu *et al.*, 2016; Chin *et al.*, 2020; Curtolo *et al.*, 2020; Lally *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2023), las cuales culminan en grandes pérdidas económicas (Li *et al.*, 2020). Por otro lado, algunas especies de cítricos ácidos han sido reportadas como menos susceptibles o tolerantes al HLB, por ejemplo: el limón rugoso (*C. jambhiri*) (Yu *et al.*, 2017), la lima australiana (*C. australasica*) (Weber *et al.*, 2022) y el limón persa (*C. latifolia*) (Sivager *et al.*, 2021).

El caso del limón persa es de alta importancia para México, y Veracruz es el principal productor y exportador de este fruto a nivel mundial. Por lo cual, es primordial comprender los mecanismos que están involucrados en la tolerancia al HLB. A este respecto, primero se asoció dicha tolerancia a una mayor capacidad de mantener sin alterar algunas funciones fisiológicas como la fotosíntesis, la conductancia estomática y la transpiración (Sivager *et al.*, 2021). Posteriormente, se observó que, a diferencia de lo observado en *Poncirus trifoliata* (Rawat *et al.*, 2017), la familia de genes *CDR* no está relacionada con la tolerancia (Flores-de la Rosa *et al.*, 2023). Recientemente se secuenció y ensambló el transcriptoma del limón persa

infectado con CLas, en el cual se observó diferentes genes expresados diferencialmente, pero fue de especial importancia notar genes relacionados con la inmunidad activada por efectores (ETI, por siglas en inglés) que mostraban un incremento en la expresión, como es el caso del gen *RPS2* (Estrella-Maldonado *et al.*, 2023).

El gen *RPS2* pertenece a un complejo conformado por los genes *RPM1-RIN4-RPS2*. La relación que existe entre estos genes está intrincadamente relacionada con la respuesta de la planta a la infección por ciertos patógenos. Por ejemplo, el gen *RPM1* funge como un receptor de efectores de la bacteria *Pseudomonas syringae* y activa ETI en *Arabidopsis* (Rose *et al.*, 2012), dicha activación es mediada por la fosforilación del gen *RIN4* (Lee *et al.*, 2015), es decir, *RIN4* induce la expresión de *RPM1*. Por otro lado, el gen *RPS2* puede activar la inmunidad contra la bacteria antes mencionada; no obstante, su interacción con el gen *RIN4* es de regulación negativa, es decir, la expresión de *RPS2* inhibe a *RIN4* y viceversa (Alam *et al.*, 2021).

Interesantemente, evidencia experimental demostró que la sobre expresión del gen *RIN4* facilita la colonización de CLas en el floema de cítricos y la generación de síntomas de HLB (Cheng *et al.*, 2022), lo que sugiere que el grado de susceptibilidad al HLB podría estar asociado al nivel de actividad del gen *RIN4*. Por lo tanto, con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue comparar la expresión de los genes del complejo *RPM1-RIN4-RPS2* en dos especies con respuesta contrastante al HLB: la naranja Valencia, altamente susceptible, y el limón persa, con una tolerancia alta a la infección por CLas.

Se obtuvo la secuencia de los transcritos de los genes *CIRPM1*, *CIRIN4* y *Cl-RPS2* a partir del transcriptoma de limón persa ensamblado por Estrella-Maldonado *et al.* (2023), para lo cual se realizó un análisis BLAST local utilizando las secuencias de los genes *CsRPM1*, *CsRIN4* y *CsRPS2* recuperadas de la base de datos Citrus Genome Database (<https://www.citrusgenomedb.org/>). Posteriormente, se realizó un alineamiento entre los homólogos de cada especie, mediante el software en línea T-COFFE (<https://tcoffee.crg.eu/apps/tcoffee/index.html>). En la Figura 1 se presenta el alineamiento de los genes *CsRIN4* y *CIRIN4*.

Una vez identificados y obtenidos los genes, se diseñaron iniciadores para medir su expresión, lo cual se realizó en el software en línea Eurofins (<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/>). Se generaron los siguientes iniciadores: para el gen *RPM1* se obtuvieron los iniciadores *RPM1-F* (5'-GCCCTGGATTTGCTGAAG-3') y *RPM1-R* (5'-GCAATATTCAACAACCTCTGGGA-3') con los cuales se esperaba obtener un producto de 130 pb; para el gen *RIN4* se diseñaron los iniciadores *RIN4-F* (5'-GCGAGAGGAGAGAAACAGTGCAGG-3') y *RIN4-R* (5'-GACGATGATGGGGTGTGGTGGGA-3') diseñados para obtener un producto de 165 pb; por último, para el gen *RPS2* se obtuvieron los iniciadores *RPS2-F* (5'-TGGTTCGATATGTAGTGGGG-3') y *RPS2-R* (5'-CTGCTTCACT-

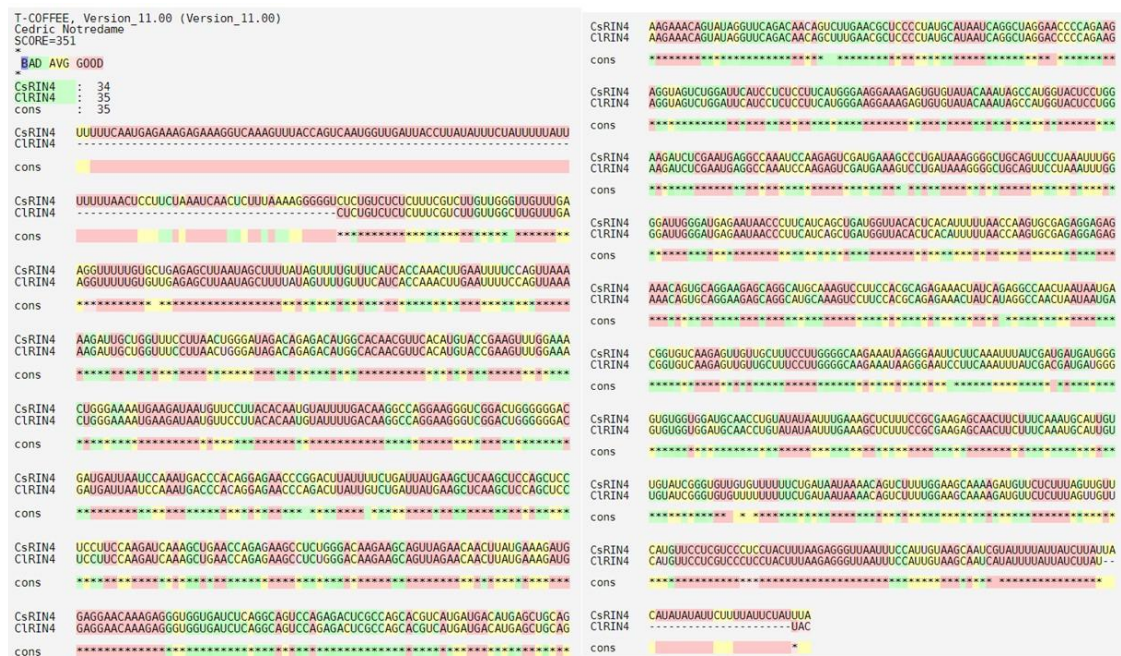


Figura 1. Alineamiento de las secuencias de los genes *CsRIN4* y *CIRIN4*.

GCTGTAGAC-3') para obtener un producto de 135 pb. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo a 60 °C para la temperatura de alineamiento.

Para realizar los ensayos de expresión del complejo, se obtuvieron muestras de hojas fisiológicamente maduras con síntomas de HLB de naranja Valencia y limón persa (Figura 1). Los tejidos se colectaron de tres árboles diferentes de cada especie. La colecta se realizó de una parcela experimental, infectada naturalmente con CLas, que se localiza en el INIFAP Campo Experimental Ixtacuaco (CEIXTA), ubicado a 112 msnm (20° 02' 36" N. 97° 05' 52.5" OE). Los árboles tienen siete años de edad y estaban injertados en el portainjerto Swingle. Las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y llevadas al laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del CEIXTA. El tejido fue macerado y dividido en dos partes, una para la detección de CLas y la otra para el ensayo de expresión.

Para la detección de CLas, se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo descrito por Rodríguez-Quiblera *et al.* (2022), tras lo cual se realizó el análisis de integridad y calidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %, 90 V por 60 min) y espectrofotometría nanodrop, respectivamente. Posteriormente, se utilizó parcialmente el protocolo descrito por Lin *et al.* (2010), que consiste en la amplificación de un fragmento del gen 16S ribosomal con los iniciadores *Las-O-F* (5'-CGGTGAATGTATTAAGCTGAGGCGTTCC-3') y *Las-O-R* (5'-TACCCA-CAACAAAATGAGATACACCAACAACCTTC-3').

Para los ensayos de expresión génica del complejo en estudio, se realizó la extracción de ARN mediante un protocolo basado en CTAB al 2 % (Estrella-Maldonado *et al.*, 2023). El ARN obtenido fue analizado para su integridad y calidad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (1 %, 90 V por 60 min) y espectrofotometría nanodrop, respectivamente. Los ARN obtenidos de alta calidad fueron tratados para eliminar el ADN residual mediante la enzima DNAsa RQ1 (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó la síntesis del ADNc, partiendo de una concentración de 500 ng μL^{-1} de ARN tratado con DNAsa, mediante la enzima M-MLV (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la amplificación de los genes del complejo en estudio mediante RT-PCR. Para esta amplificación, la reacción fue buffer de PCR 1X, MgCl_2 25 mM, 10 mM de cada dNTP, 10 μM de cada iniciador, 1 U de DNA Taq polimerasa y 300 ng de ADNc, teniendo un volumen final de reacción de 10 μL . El ciclo térmico de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s y polimerización a 72 °C por 15 s, tras lo cual se realizó una extensión final a 72 °C por 3 min. El producto de la amplificación fue analizado mediante gel de agarosa al 2 %, teñido en bromuro de etidio al 1.2 % y visualizado en luz UV. Se utilizó el gen *F-box* como control endógeno (Mafra *et al.*, 2012). Cada muestra se amplificó por triplicado como réplica técnica.

Respecto a la detección del agente causal del HLB en las muestras, se obtuvo un fragmento único de 470 pb (datos no mostrados) en las muestras sintomáticas (Figura 2) de limón persa (tres muestras) y naranja Valencia (tres muestras), lo que corrobora la infección de las muestras con CLAs de acuerdo al protocolo utilizado.

De acuerdo a los resultados de expresión génica, en la amplificación por RT-PCR se observó que en lo relativo al gen *RPM1* no hay diferencia observable entre las muestras de naranja Valencia y limón persa. Por otro lado, para el gen *RPS2* se observó diferencia en la intensidad de la banda amplificada, siendo mayor en limón persa que en naranja, sugiriendo que existe diferencia en la actividad de este gen ante la infección por CLAs, lo que concuerda con lo observado previamente por Estrella-Maldonado *et al.* (2023). Sin embargo, la principal diferencia se observó en la amplificación del gen *RIN4*, este gen se ve claramente amplificado en naranja Valencia, mientras que no es detectable la amplificación de dicho gen en limón persa. Esto sugiere que existe una mayor actividad del gen *RIN4* en una especie altamente susceptible al HLB, en contraste con una especie con un alto nivel de tolerancia como el limón persa, similar a lo que se ha propuesto de la participación del gen *RIN4* en la infección de CLAs (Cheng *et al.*, 2022). Los resultados se muestran en la Figura 3.

Recientemente se ha descrito que el HLB es una enfermedad que está más relacionada con una respuesta de defensa exacerbada y descontrolada ante CLAs que en sí por el daño causado por el patógeno (Ma *et al.*, 2022), por lo cual comprender



Figura 2. Síntomas de HLB presentes en hojas de limón persa (A) naranja Valencia (B) y frutos de limón persa (C) y naranja Valencia (D).

GEN	NARANJA 2	NARANJA 3	NARANJA 4	LIMÓN 1	LIMÓN 2	LIMÓN 3
FBOX	[Gel image showing bands for FBOX across all samples]					
RIN4	[Gel image showing bands for RIN4 across all samples, with red arrows pointing to bands in LIMÓN 1, LIMÓN 2, and LIMÓN 3]					
RPM1	[Gel image showing bands for RPM1 across all samples]					
RPS2	[Gel image showing bands for RPS2 across all samples]					

Figura 3. Expresión del complejo *RPM1-RIN4-RPS2* mediante RT-PCR en naranja Valencia, especie altamente susceptible al HLB, y limón Persa especie con un alto nivel de tolerancia al HLB.

los mecanismos que se alteran en la defensa de la planta es imprescindible para el diseño de estrategias de control de esta enfermedad. Los resultados obtenidos en el presente estudio son evidencia que soportan la hipótesis de que la infección por CLas y el desarrollo del HLB está facilitado por la expresión del gen *RIN4*. Este fenómeno se ha observado en otros patosistemas, en los cuales *RIN4* actúa como un represor de la Inmunidad Activada por Patrones Moleculares (PTI) (Ray *et al.*, 2019), especialmente inactivando la respuesta por *RPS2* (Belkhadir *et al.*, 2004), mientras que su fosforilación induce la activación de ETI (Xu *et al.*, 2017). Es importante destacar que la sobre expresión de *RIN4* ha demostrado que inhibe la deposición de calosa en respuesta a los patógenos (Afzal *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2019), dicha inhibición de la producción de calosa es uno de los mecanismos que utiliza CLas para translocarse dentro del floema (Bernardini *et al.*, 2022), mientras que el incremento de calosa en zonas con baja presencia de CLas se debe más a la respuesta descontrolada de la planta (Archor *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2022).

El presente estudio muestra evidencia de que existe una expresión diferencial del gen *RIN4* entre cítricos infectados naturalmente con CLas (seis muestras analizadas), de acuerdo a su nivel de susceptibilidad al HLB. Es necesario realizar estudios adicionales que confirmen esta hipótesis; sin embargo, nuestros resultados sugieren que el gen *RIN4* es un blanco molecular importante para la inducción de tolerancia al HLB mediante herramientas biotecnológicas (Sun *et al.*, 2019).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento realizado al proyecto “Fortalecimiento del equipo e infraestructura para el estudio y control de las principales enfermedades de cítricos para incidir en el bienestar social de la zona citrícola de Veracruz” (No. Proyecto 322068). E.A.M.P. Agradece la beca otorgada por el CONAHCYT para la realización de su tesis de licenciatura en el proyecto mencionado.

LITERATURA CITADA

- Achor D, Welker S, Ben-Mahmoud S, Wang C, Folimonova SY, Dutt M, Gowda S and Levy A. 2020. Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Movement and Sieve-Pore Plugging in Citrus Sink Cells. *Plant Physiology* 182(2): 882 – 891. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01391>
- Afzal AJ, da Cunha L and Mackey D. 2011. Separable Fragments and Membrane Tethering of *Arabidopsis RIN4* Regulate Its Suppression of PAMP-Triggered Immunity. *Plant Cell* 23(10): 3798 – 3811.
- Ajene IJ, Khamis F, van Asch B, Pietersen G, Amondi Rasowo B, Ekesi S and Mohammed S. 2020. Habitat suitability and distribution potential of *Liberibacter* species (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and “*Candidatus Liberibacter africanus*”) associated with citrus greening disease. *Diversity and Distributions* 26: 575 – 588. <https://doi.org/10.1111/ddi.13051>

- Alam M, Tahir J, Siddiqui A, Magzoub M, Shahzad-ul-Hussan S, Mackey D and Afzal J. 2021. RIN4 homologs from important crop species differentially regulate the *Arabidopsis* NB-LRR immune receptor, RPS2. *Plant Cell Reports* 40: 2341 – 2356. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02771-9>
- Belkhadir Y, Nimchuk Z, Hubert DA, Mackey D and Dangl JL. 2004. *Arabidopsis* RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by *RPS2* and *RPM1* downstream or independent of the *NDR1* signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* 16(10): 2822 – 2835. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024117>
- Bernardini C, Turner D, Wang C, Welker S, Achor D, Ascanda Artiga Y, Turgeon R and Levy A. 2022. *Candidatus* Liberibacter asiaticus accumulation in the phloem inhibits callose and reactive oxygen species. *Plant Physiology* 190(2): 1090 – 1094. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac346>
- Cheng C, Zhong Y, Wang B, Zhang Y, Wu H, Jiang N, Wu B, Lv Y and Jiang B. 2022. The Upregulated Expression of the Citrus RIN4 Gene in HLB Diseased Citrus Aids *Candidatus* Liberibacter Asiaticus Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 23(13): 6971. <https://doi.org/10.3390/ijms23136971>
- Chin EL, Ramsey JS, Mishchuk DO, Saha S, Foster E, Chavez JD, Howe K, Zhong X, Polek M, Godfrey KE, Mueller LA, Bruce JE, Heck M and Slupsky CM. 2020. Longitudinal Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Analyses of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Graft-Inoculated with “*Candidatus* Liberibacter asiaticus”. *Journal of Proteome Research* 19(2): 719 – 732. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00616>
- Curtolo M, de Souza Pacheco I, Pires Boava L, Takita MA, Moreira Granato L, Manzano Galdeano D, Alves de Souza A, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2020. Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. *Scientific Reports* 10: 20865. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77840-2>
- da Graça JV, Cook G, Ajene IJ, Grout TG, Pietersen G, Roberts R, Bester R, Pretorius MC and Maree HJ. 2022. A Review of the ‘*Candidatus* Liberibacter africanus’ Citrus Pathosystem in Africa. *Phytopathology* 112: 44 – 54. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-21-0296-FI>
- Estrella-Maldonado H, González-Cruz C, Matilde-Hernández C, Adame-García J, Santamaría JM, Santillán-Mendoza R and Flores-de la Rosa FR. 2023. Insights into the Molecular Basis of Huanglongbing Tolerance in Persian Lime (*Citrus latifolia* Tan.) through a Transcriptomic Approach. *International Journal of Molecular Sciences* 24(8): 7497. <https://doi.org/10.3390/ijms24087497>
- Flores-de la Rosa FR, González-Cruz C, Adame-García J, Chan-León AC, Santillán-Mendoza R, Santamaría JM and Estrella-Maldonado H. 2023. Transcriptome-wide Identification of CDR Family in *Citrus latifolia* and its Expression During HLB Disease. *Tropical Plant Biology*. <https://doi.org/10.1007/s12042-023-09328-y>
- Fu S, Shao J, Zhou C and Hartung JS. 2016. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ and two strains of Citrus Tristeza Virus. *BMC Genomics* 17: 349. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>
- Gao C, Li C, Li Z, Liu Y, Li J, Guo J, Mao J, Fang F, Wang C, Deng X and Zheng Z. 2023. Comparative transcriptome profiling of susceptible and tolerant citrus species at early and late stage of infection by “*Candidatus* Liberibacter asiaticus”. *Frontiers in Plant Sciences* 14: 1191029. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1191029>
- Ghosh D, Kokane S, Kumar Savita B, Kumar P, Kumar Sharma A, Ozcan A, Kokane A and Santra S. 2022. Huanglongbing Pandemic: Current Challenges and Emerging Management Strategies. *Plants* 12(1): 160. <https://doi.org/10.3390/plants12010160>
- Huang J, Alanís-Martínez I, Kumagai L, Dai Z, Zheng Z, Pérez de León AA, Chen J and Deng X. 2022. Machine learning and analysis of genomic diversity of “*Candidatus* Liberibacter asiaticus” strains from 20 citrus production states in Mexico. *Frontiers in Plant Science* 13:1052680. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052680>
- Lally RD, Donaleshen K, Chirwa U, Eastridge K, Saintilnord W, Dickinson E, Murphy R, Borst S, Horgan K and Dawson K. 2021. Transcriptomic Response of Huanglongbing-Infected *Citrus sinensis* Following Field Application of a Microbial Fermentation Product. *Frontiers in Plant Science* 12: 754391. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.754391>
- Lee D, Bourdais G, Yu G, Robatzek S and Coaker G. 2015. Phosphorylation of the Plant Immune Regulator RPM1-INTERACTING PROTEIN4 Enhances Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity and Inhibits Flagellin-Triggered Immune Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27(7): 2042 – 2056. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132308>

- Li S, Wu F, Duan Y, Singerman A and Guan Z. 2020. Citrus Greening: Management Strategies and Their Economic Impact. *HortScience* 55(5): 604 – 612. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14696-19>
- 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: 17 – 25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>
- Ma W, Pang Z, Huang X, Xu J, Shankar Pandey S, Li J, Achor DS, Vasconcelos FNC, Hendrich C, Huang Y, Wang W, Lee D, Stanton D and Wang N. 2022. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nature Communications* 13: 529. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28189-9>
- Mafra V, Kubo KS, Alvez-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM and Machado MA. Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. *PLoS ONE* 7(2): 31263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031263>
- McCollum G, Hilf M, Irey M, Luo W and Gottwald T. 2016. Susceptibility of sixteen citrus genotypes to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Plant Disease* 100: 1080 – 1086. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0940-RE>
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan YP, Bowman KD, Gmitter FGJr and Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticulture Research* 15(4): 17064. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Ray SK, Macoy DM, Kim WY, Lee SY and Kim MG. 2019. Role of *RIN4* in Regulating PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity: Current Status and Future Perspectives. *Molecules and Cells* 42(7): 503 – 511. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.2433>
- Ribeiro C, Xu J, Hendrich C, Shankar Pandey S, Yu Q, Gmitter FGJr and Wang N. 2023. Seasonal Transcriptome Profiling of Susceptible and Tolerant Citrus Cultivars to Citrus Huanglongbing. *Phytopathology* 113(2): 286 – 298. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0179-R>
- Rodríguez-Quibrera CG, Almeyda-León IH, Flores-de la Rosa FR, Hernández-Mendoza JL, Cruz-Hernández MA y Mendoza-Herrera A. 2022. Identificación de proteínas en *Candidatus Liberibacter asiaticus* para desarrollar un método de detección inmunoenzimático. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13(8): 1489 – 1494. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i8.3355>
- Rose L, Atwell S, Grant M and Holub EB. 2012. Parallel loss-of-function at the RPM1 bacterial resistance locus in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 3: 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00287>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2022. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>. Consultado el 10 de julio de 2023.
- Sivager G, Calvez L, Bruyere S, Boisne-Noc R, Brat P, Gros O, Ollitrault P and Morillon R. 2021. Specific Physiological and Anatomical Traits Associated With Polyploidy and Better Detoxification Processes Contribute to Improved Huanglongbing Tolerance of the Persian Lime Compared With the Mexican Lime. *Frontiers in Plant Science* 12: 685679. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.685679>
- Sun L, Nashrullah, Ke F, Nie Z, Wang P and Xu J. 2019. Citrus Genetic Engineering for Disease Resistance: Past, Present and Future. 20(21): 5256. <https://doi.org/10.3390/ijms20215256>
- Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ and Bové J. 2005. ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1857 – 1862. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63677-0>
- Weber KC, Mahmoud LM, Stanton D, Welker S, Qiu W, Grosser JW, Levy A and Dutt M. 2022. Insights into the mechanism of Huanglongbing tolerance in the Australian finger lime (*Citrus australasica*). *Frontiers in Plant Sciences* 13:1019295. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1019295>
- Xu N, Luo X, Li W, Wang Z and Liu J. 2017. The Bacterial Effector AvrB-Induced *RIN4* Hyperphosphorylation Is Mediated by a Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Complex in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 30(6): 502 – 512. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-17-0017-R>
- Yu Q, Chen C, Du D, Huang M, Yao J, Yu F, Brlansky RH and Gmitter FGJr. 2017. Reprogramming of a defense signaling pathway in rough lemon and sweet orange is a critical element of the early response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Horticulture Research* 4: 17063. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.63>