

Housekeeping genes selection for gene expression on *Citrus sinensis* infected with CLAs or CTV using RT-qPCR

Selección de genes de referencia en expresión génica de *Citrus sinensis* infectados con CLAs o CTV mediante RT-qPCR

Rosa Isela Triana-Gutiérrez, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa*, ¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura; Gustavo Mora-Aguilera, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología; Raquel Cano-Medrano¹, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5. Carretera México- Texcoco. Texcoco de Mora, Estado de México. CP. 56230; José Joaquín Velázquez-Monreal, INIFAP- CE Tecomán. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecomán, Colima, México. *Autor para correspondencia: alexge@colpos.mx

Recibido: 27 de Febrero, 2021.

Aceptado: 18 de Abril, 2021.

Triana-Gutiérrez RI, Gutiérrez-Espinosa MA, Mora-Aguilera G, Cano-Medrano R and Velázquez-Monreal JJ. 2021. Housekeeping genes selection for gene expression on *Citrus sinensis* infected with CLAs or CTV using RT-qPCR. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 354-370.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2102-2>

Primera publicación DOI: 30 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 30, 2021.

Resumen. Una posible alternativa para el control de CTV y CLAs en *Citrus sinensis* es el empleo de resistencia genética adquirida. El estudio de este mecanismo, requiere normalizar con genes de referencia. Por lo tanto, se desarrolló un protocolo de cuantificación de expresión génica mediante RT-qPCR para evaluar el uso potencial de *GAPDH*, *ACTINA*, *F-BOX*, *COX* y *18S rRNA* como genes de referencia en cítricos. Un total de nueve plantas infectadas con CTV (3), CLAs (3) y sanas (3) se emplearon para seleccionar una muestra compuesta

Abstract. A possible alternative for the control of CTV and CLAs in *Citrus sinensis* is the use of systemic acquired resistance. The study of this mechanism requires normalizing with reference genes. Therefore, a gene expression quantification protocol using RT-qPCR was developed to evaluate the potential use of *GAPDH*, *ACTIN*, *F-BOX*, *COX*, and *18S rRNA* as *reference genes* in citrus. A total of nine plants infected with CTV (3), CLAs (3), and healthy (3) were used to select a composed sample of eight leaves/plant. An in-house protocol was developed and optimized in all its stages, varying the concentration of reagents, primers, and reaction template. Extraction of total RNA with 2% CTAB was in the range of 200-1000 ng μL^{-1} . The reverse transcription produced on average 1069 ng μL^{-1} cDNA. The *reference gene* products *GAPDH*, *ACTINA*, and *F-BOX* exhibited melting curves without dimer products, $C_t \leq 28$, and reaction efficiencies in the range of 90-110%. In all gene expressions, CTV infected samples had the higher C_t 's (25-27) followed by healthy samples (24-25).

de ocho hojas/planta. El protocolo no comercial se desarrolló y optimizó en todas sus etapas variando concentración de reactivos, iniciadores y sustrato de reacción. La extracción del ARN total con CTAB al 2% estuvo en el rango de 200-1000 ng μL^{-1} . La retrotranscripción produjo en promedio 1069 ng μL^{-1} ADNc. Los productos de los *genes de referencia* *GAPDH*, *ACTINA* y *F-BOX* exhibieron curvas de disociación sin expresión de dímeros, $C_t \leq 28$ y eficiencias de reacción en el rango de 90-110%. En todas las expresiones de genes, muestras con CTV tuvieron los C_t 's más tardíos (25-27) seguido de las muestras sanas (24-25). Sin embargo, *GAPDH* y *ACTINA* presentaron la expresión génica más estable ($\ln 1/M = 2.83$) por lo que estos genes se proponen para normalización. El protocolo RT-qPCR fue también específico y eficiente para el gen *CDR13*, putativamente asociado a resistencia sistémica adquirida a CLas, lo que sugiere su viabilidad en estudios de resistencia de *C. sinensis/C. aurantium* en respuesta a la infección de CTV y CLas.

Palabras clave: Transcriptoma, Naranja, *CDR13*, *ACTINA*, *GAPDH*

En 2018, México fue el cuarto productor de naranja (*Citrus sinensis*) en el mundo con 4.7 millones de toneladas, de las cuales el 98% se destinó al consumo interno (SIAP, 2019; Rivera-López *et al.*, 2020). Sin embargo, la producción histórica no exhibe el potencial productivo nacional y representa una citricultura altamente heterogénea determinada por la diversidad tecnológica, régimen hídrico, factores edáficos y problemas fitosanitarios. Diversos programas federales y/o estatales se han implementado para impulsar la productividad e incluso promover la reconversión citrícola. En particular, en las últimas dos décadas se han establecido campañas

However, *GAPDH* and *ACTIN* had the most stable gene expression ($\ln 1/M = 2.83$), therefore these genes are proposed for normalization. The RT-qPCR protocol was also specific and efficient for the *CDR13* gene, putatively associated with systemic acquired resistance to CLas, which suggest its viability in resistance studies of *C. sinensis/C. aurantium* in response to CTV and CLas infection.

Key words: Transcriptome, Orange, *CDR13*, *ACTIN*, *GAPDH*.

In 2018, Mexico was the fourth largest sweet orange (*Citrus sinensis*) producer in the world, with 4.7 million tons, 98% of which was used for domestic consumption (SIAP, 2019; Rivera-López *et al.*, 2020). However, historical production does not show the national productive potential and represents a highly heterogenous citrus production, determined by technological diversity, water regimes, edaphic factors and phytosanitary problems. Several federal and/or state programs have been implemented to boost productivity and even promote the modernizing of the citrus sector. Particularly in the last two decades, national phytosanitary campaigns have been established for the management of the *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). These pathogens have a high epidemic potential, due to the dispersal capacity and agroecological adaptation of their vectors, the systemic infection condition and their genetic variability (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Domínguez-Monge *et al.*, 2014; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). The CTV, and recently CLas, have caused important economic losses in Brazil, Argentina, USA, Venezuela and other countries, and have modified the world's citrus production

fitosanitarias nacionales para el control del *Citrus tristeza virus* (CTV) y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). Estos patógenos poseen alto potencial epidémico por la capacidad de dispersión y adaptación agroecológica de sus vectores, condición infectiva sistémica y su variabilidad genética (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Domínguez-Monge *et al.*, 2014; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). El CTV y recientemente CLAs, han causado fuertes pérdidas productivas en Brasil, Argentina, EUA, Venezuela y otros países, y han modificado los modelos productivos cítricos mundiales (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Dowson *et al.*, 2015). En México, CLAs, causante de la enfermedad denominada huanglongbing o HLB, es una bacteria restringida al floema transmitida eficientemente por *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). En este país, la expresión de síntomas en *C. sinensis* está influenciada por el portainjerto y la variante de secuencia de la bacteria pudiendo incluso ser asintomática en campo (Martínez-Bustamante *et al.*, 2015). Por el contrario, la expresión de síntomas en cítricos agrios es de mayor intensidad pero también dependiente de la genética del portainjerto y patógeno. Así, en *C. aurantifolia/C. macrophylla* se manifiesta clorosis foliar asimétrica, aborto de semillas y deformación de frutos, típicamente reportadas en naranjos de Brasil y Florida, pero además exhibe amarillamiento generalizado de follaje (Esquivel-Chávez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

CTV, causal de la enfermedad ‘tristeza de los cítricos’, es un closterovirus asociado al floema y transmitido en forma semipersistente por un complejo de áfidos vectores (Hemiptera: Aphididae) entre los que destacan *Aphis gossypii* y *Toxoptera citricida* en México (Dowson *et al.*, 2015; Loeza-Kuk *et al.*, 2011). Contrario al escenario epidémico de los 30’s en Sudamérica, caracterizado por mar-

models (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Dowson *et al.*, 2015). In Mexico, CLAs, which causes the diseased named huanglongbing or HLB, is a bacterium, restricted to the phloem efficiently transmitted by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). In this country, the symptoms expression in *C. sinensis* is influenced by the rootstock and the bacterium sequence variant, and can even be asymptomatic under field condition (Martínez-Bustamante *et al.*, 2015). In contrast, the symptoms expression in sour citrus species is more intense, yet also dependent on the rootstock and pathogen genetics. Thus, *C. aurantifolia/C. macrophylla* displays asymmetric foliar chlorosis, seed abortion and fruit deformities, typically reported in orange trees in Brazil and Florida, but it also presents a generalized yellowing of the foliage (Esquivel-Chávez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

CTV, causal agent of the ‘citrus tristeza’ disease, is a closterovirus related to the phloem and transmitted semi-persistently by a vector aphid complex (Hemiptera: Aphididae), including *Aphis gossypii* and *Toxoptera citricida*, the most important in Mexico (Dowson *et al.*, 2015; Loeza-Kuk *et al.*, 2011). In this country, as opposed to the epidemic scenario of the 1930’s in South America, in which wilting (‘tristeza’) and quick decline and death of about 15 million *C. sinensis/C. aurantium* trees became a notorious characteristic, the predominant condition has been asymptomatic and subendemic since pathogen detection in the 1980’s (G. Mora-Aguilera, 2018. Personal communication; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). Simulation models show that moderate races selection has operated on this virus in detriment of severe races, maintaining a relatively stable population structure with limited genotypic variability (G. Mora-Aguilera, 2018. Personal communication). However, this apparent equilibrium may be temporarily altered with the

chitez (tristeza) y muerte rápida de aproximadamente 15 millones árboles *C. sinensis/C. aurantium*, en México la condición predominante ha sido asintomática y subendémica a partir de la detección del patógeno en los 80's (G. Mora-Aguilera, 2018. Comunicación personal; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). Modelos simulativos demuestran que la selección de razas moderadas ha operado en este virus en detrimento de razas severas manteniendo una estructura poblacional relativamente estable con limitada variabilidad genotípica (G. Mora-Aguilera, 2018. Comunicación personal). Sin embargo, este aparente equilibrio puede ser temporalmente alterado con introducción de nuevas razas, desbalances inducidos por factores climáticos y microbiológicos, como es el caso del reciente brote reportado en el centro de Veracruz (Martínez-Bustamante *et al.*, 2020). La dificultad de controlar estos patógenos con estrategias convencionales (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; Loeza-Kuk *et al.*, 2011), y la necesidad de producir materiales genéticos resistentes en menor tiempo posible (CTV) o ante la ausencia de fuentes de resistencia viables para estos patógenos (CLas), propició en los 90's la obtención exitosa de cítricos transgénicos, primero en CTV y posteriormente en CLas (Soares *et al.*, 2020; Loeza-Kuk *et al.*, 2011; Gutiérrez-Espinosa *et al.*, 1997). Sin embargo, regulaciones de bioseguridad ha limitado su implementación comercial. Nuevas tecnologías genómicas han favorecido el estudio de genes endógenos del hospedero, en oposición a un gen exógeno implícito en la tecnología transgénica, explotando la expresión contrastante de síntomas en función de genética del patógeno implicado en la infección y la composición injerto/portainjerto. Este fenómeno natural, conocido como *resistencia sistémica adquirida* puede ser potenciado a través de estudios transcriptómicos mediante análisis de expresión diferencial a nivel de ARNm de genes que responden a un proceso patogénico respecto

introduction of new races and imbalances due to climate and microbiological factors, such as those implied by the recent outbreak reported in central Veracruz (Martínez-Bustamante *et al.*, 2020). The difficulty of controlling these pathogens with conventional strategies (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; Loeza-Kuk *et al.*, 2011), along with the need to produce resistant genetic materials in the least time possible (CTV) or the lack of feasible resistance sources against these pathogens (i.e. CLas) led to successfully obtain transgenic citrus material in the 1990's, first on CTV and later on CLas (Soares *et al.*, 2020; Loeza-Kuk *et al.*, 2011; Gutiérrez-Espinosa *et al.*, 1997). Nevertheless, biosafety regulations have limited their extensive commercial implementation. New genomic technologies have favored the study of endogenous hosts genes, as opposed to an exogenous gene implicit in transgenic technology, exploiting the contrasting expression of symptoms based on the pathogen genetic and the graft/rootstock composition. This natural phenomenon, known as *systemic acquired resistance* may be strengthened through transcriptomic studies by differential expression analyses, at the level of mRNA, of genes that respond to a pathogenic process respect to *reference genes* from the host or 'housekeeping' (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016; Mafra *et al.*, 2013). The latter genes are essential for the plant physiology; therefore, its expression is not dependent, in theory, of the infections process (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2006). An earlier investigation cloned three endogenous genes that may eventually provide resistance from pathogens in citrus species, including CLas and CTV, through its sustained expression in high concentrations in the cisgenic plants, providing resistance with its own genes (Ventura-Medina *et al.*, 2019). A crucial stage in this cisgenic approach is the quantification of the

a *genes de referencia* del hospedero o ‘housekeeping’ (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016; Mafra *et al.*, 2013). Estos últimos genes son esenciales para la fisiología de la planta por lo que su expresión no es dependiente, teóricamente, de un proceso infeccioso (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2006). En un trabajo previo se logró clonar tres genes endógenos que podrían eventualmente conferir resistencia a patógenos en cítricos, incluyendo a CLas y CTV, a través de su sostenida expresión en altas concentraciones en las plantas cisgénicas induciendo resistencia con sus propios genes (Ventura-Medina *et al.*, 2019). Una etapa fundamental en este enfoque cisgénico es cuantificar la expresión de un gen endógeno potencial en respuesta a la interacción planta-patógeno, lo cual es dependiente de la correcta selección de un *gen de referencia* (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012). En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un protocolo que permitiera evaluar la expresión de cinco *genes de referencia* con base a criterios de eficiencia y estabilidad en el proceso de amplificación por RT-qPCR respecto al gen endógeno *CDR13* transcrito en respuesta a la infección de CLas y CTV en plantas *C. sinensis/C. aurantium* para futuros estudios de *resistencia sistémica adquirida* en las condiciones citrícolas y fitosanitarias mexicanas.

Material vegetal. En mayo 2019 se seleccionaron nueve plantas de *C. sinensis* injertadas en *C. aurantium* provenientes de la colección COLPOS-INIFAP establecida en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecmán (INIFAP-CE Tecmán). Este material se mantuvo durante la investigación en condiciones de invernadero en COLPOS Montecillo. El experimento incluyó tres plantas por cada condición sanitaria: a) CTV positivas, b) CLas positivas y c) sanas. La condición enferma

expression of a potentially endogenous gene in response to the plant-pathogen interaction, which depends on the correct selection of a *reference gene* (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012). In this context, the aim of this investigation was to develop an in-house protocol to evaluate the expression of five *reference genes* based on efficiency and stability criteria in the amplification process with RT-qPCR regarding the endogenous *CDR13* gene transcribed in response to CLas and CTV infection in *C. sinensis/C. aurantium* for future *systemic acquired resistance* studies under the Mexican citrus production and phytosanitary condition.

Plant material. In May 2019, nine *C. sinensis* plants, grafted onto *C. aurantium*, were chosen from the COLPOS-INIFAP collection established in the Tecoman experimental station of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP-CE Tecmán). This material was kept during the investigation under greenhouse conditions in COLPOS Montecillo. The experiment included three plants for each sanitary condition: a) positive to CTV, b) positive to CLas and c) healthy. The diseased and healthy conditions were confirmed by qPCR in the Fruiticulture laboratory, COLPOS. The diseased plants were inoculated in 2014 with infected citrus tissue from Jalisco and Puebla commercial orchards. The healthy plants were 18-months-old. The plant sample used for the extraction of nucleic acids consisted of eight mature leaves per plant from different orientation and strata.

Extraction, quantity and quality of RNA. For extraction of total RNA, 0.1 g of midrib leaves (*C. sinensis*) were used with the CTAB protocol at 2%. Yield and quality of total nucleic acids were quantified using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). The optic density rate at 260/280

y sana se confirmó por qPCR en el laboratorio de Fruticultura, COLPOS. Las plantas enfermas se inocularon en 2014 con inóculo procedente de Jalisco y Puebla, respectivamente. Las plantas sanas fueron de 18 meses de edad. La muestra vegetal empleada para la extracción de ácidos nucleicos consistió de ocho hojas maduras por planta provenientes de diferente orientación y estrato.

Extracción, cuantificación y calidad de ARN.

Para la extracción de ARN total se empleó 0.1 g de nervadura central de hojas de naranjo (*C. sinensis*) mediante el protocolo de CTAB al 2%. Se cuantificó el rendimiento y calidad de ácidos nucleicos totales empleando el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se verificó que la tasa de densidad óptica a 260/280 y 260/230 nm de longitud de onda se mantuviera en el rango 1.8-2.0 para garantizar ausencia de contaminación por proteínas o fenoles. La extracción de ácidos nucleicos totales permitió obtener concentraciones de 200-1000 ng μL^{-1} a partir de nervadura central foliar de *C. sinensis* (Cuadro 1). En todas las muestras las cantidades

and 260/230 nm wavelengths was evaluated to assured a 1.8-2.0 range to guarantee the absence of proteins or phenols contamination. The extraction of total nucleic acid allowed to obtain concentrations of 200-1000 ng μL^{-1} (Table 1). In all samples, the amounts obtained were enough to homogenize a subsample at 50 ng μL^{-1} . This stage was crucial for the correct comparison of differential expression of the evaluated genes, avoiding over- or underestimating them. The optical density rate (260/280) was in the 1.93 - 2.01 range (Table 1), meaning that the quality and purity of the nucleic acids were within an optimal range. Values below 1.8 indicate the presence of proteins, phenols or other contaminants (Taylor *et al.*, 2015).

Retrotranscription. For the cDNA synthesis, 50 ng μL^{-1} RNA were used after homogenizing with nuclease-free water. Retrotranscription with dT oligos was performed in two stages using an in-house protocol. Five trials were carried out with the purpose of optimizing the cDNA concentration (Table 2). The reaction mixture at the first stage

Cuadro 1. Cantidad y calidad de ARN total extraído a partir de nervadura central de una muestra foliar compuesta por planta de *Citrus sinensis*/C. *aurantium*.
Table 1. Quantity and quality of total RNA extracted from midrib leaves of a composed sample per plant of *Citrus sinensis*/C. *aurantium*.

Material Vegetal ^x	Conc. Ácido Nucleico (ng μL^{-1})	Tasa 260/280	Tasa 260/230 ^z
Planta sana/R1	976.2	2.02	1.96
Planta sana/R2	779.3	1.93	1.92
Planta sana/R3	628.2	1.94	1.94
+CLas (Jalisco)/R1	1186.7	2.01	1.97
+CLas (Jalisco)/R2	1070.5	1.94	1.8
+CLas (Jalisco)/R3	236.2	1.94	1.9
+CTV (Puebla)/R1	750.3	1.94	1.86
+CTV (Puebla)/R2	983.2	1.95	1.93
+CTV (Puebla)/R3	756.7	1.97	1.81

^x CLas: *Candidatus* Liberibacter asiaticus; CTV: *Citrus tristeza virus*; R₁₋₃: repetición.

^x CLas: *Candidatus* Liberibacter asiaticus; CTV: *Citrus tristeza virus*; R₁₋₃: replicates.

^z Tasa de densidad óptica obtenida con dos longitudes de onda luz UV.

^z Optical density rate obtained with two UV light wavelengths.

obtenidas fueron suficientes para homogenizar una submuestra de 50 ng μL^{-1} . Esta etapa fue indispensable para la correcta comparación de la expresión diferencial entre los genes evaluados evitando sobre o subestimarlos. La tasa de densidad óptica (260/280) estuvo en el rango 1.93-2.01 (Cuadro 1), lo cual implicó que la calidad y pureza de los ácidos nucleicos estuvo dentro de rango óptimo. Valores inferiores a 1.8 indican presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes (Taylor *et al.*, 2015).

Retrotranscripción. Para síntesis de ADNc se empleó 50 ng μL^{-1} de ARN previa homogenización con agua libre de nucleasas. La retrotranscripción con oligos dT se realizó en dos etapas mediante un protocolo no comercial. Se realizaron cinco ensayos con el fin de optimizar la concentración de ADNc (Cuadro 2). La mezcla de reacción de la primera etapa se incubó a 85 °C por 3 min en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. Transcurrido

was incubated at 85 °C for 3 min in a Bio-Rad T100™ Thermal Cycler, thereafter the samples were placed in ice for 5 min.

Further, the volume corresponding to the reaction mixture of the second stage was added into each tube. Trials 1 and 2 were incubated at 44 °C for 60 min, whereas trials 3-5 were incubated at 44 °C for 100 min. In all trials, retrotranscriptase was deactivated at 92 °C for 10 min. The cDNA obtained was kept at -20 °C and quantified by spectrophotometry using the NanoDrop 2000 to evaluate the yield obtained.

The cDNA synthesis was carried out successfully by incubating at 44 °C for 100 min with the trial 5 configuration. This trial extended the time of enzymatic synthesis, which helped obtain average concentrations of 1069 ng μL^{-1} . The remaining trials produced lower average yields with 666-680 ng μL^{-1} (trials 1 and 4) and 865-880 ng μL^{-1} (trials 2 and 3). An optimum yield guarantees enough

Cuadro 2. Reactivos y volumen empleado en cinco ensayos para generar una mezcla óptima de reacción (1X) aplicable a la primera y segunda etapa de retrotranscripción (RT) a partir de ARN total obtenido de tejido foliar de *C. sinensis* con tres condiciones sanitarias.
Table 2. Reagents and volume used in five trials to generate an optimum reaction mixture (1X), applicable to the first and second stages of retrotranscription (RT) from total RNA obtained from *C. sinensis* foliar tissue with three sanitary conditions.

Primera etapa de retrotranscripción					
Reactivos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
RNA (50 ng μL^{-1})	3.00 ^y	3.0	3.50	3.00	3.00
^z Oligo (dT) ₁₅ Iniciador (50 mM)	0.25	0.3	0.50	0.50	0.50
H ₂ O libre de nucleasas	10.50	9.2	13.25	14.35	8.75
Volumen final (μL)	13.75	12.5	17.25	16.85	12.25
Segunda etapa de retrotranscripción					
^z Buffer-RT (5X)	4.00	4.0	4.50	4.20	4.50
^z dNTP Mix (10 mM)	1.00	1.2	1.50	1.20	1.50
^z M-MLV (2000 U μL^{-1})	1.00	2.0	1.00	1.50	1.50
^z RNasin (40 U μL^{-1})	0.25	0.3	0.25	0.25	0.25
Volumen final (μL)	20.00	20.0	25.00	25.00	20.00

^yTodas las cantidades por ensayo en μL . / ^yAll amounts per trial in μL .

^zProveedor: Promega Corp. USA. / ^zSupplier: Promega Corp. USA.

este tiempo las muestras fueron colocadas en hielo durante 5 min.

Posteriormente, a cada tubo se adicionó el volumen correspondiente a la mezcla de reacción de la segunda etapa. El ensayo 1 y 2 se incubaron a 44 °C por 60 min, mientras que los ensayos 3-5 se incubaron a 44 °C por 100 min. En todos los ensayos se desactivó la retrotranscriptasa a 92 °C por 10 min. El ADNc obtenido se mantuvo a -20 °C y se cuantificó por espectrofotometría empleando el NanoDrop 2000 para evaluar el rendimiento obtenido.

La síntesis de ADNc se realizó exitosamente incubando a 44 °C por 100 min mediante la configuración del ensayo 5. Este ensayo prolongó el tiempo de síntesis enzimática lo cual permitió obtener concentraciones promedio de 1069 ng μL^{-1} . Los ensayos restantes generaron rendimientos promedio menores con 666-680 ng μL^{-1} (ensayo 1 y 4) y 865-880 ng μL^{-1} (ensayos 2 y 3). Un óptimo rendimiento garantiza la cantidad suficiente de ADNc para implementar RT-qPCR simultáneos con varios iniciadores asociados a múltiples genes. También reduce reactivos y consumibles empleados por muestra. Por otra parte, el Oligo-dT es empleado en 40% de ensayos RT-qPCR debido a que se hibrida a las colas de poly A de ARNm en comparación con un iniciador aleatorio alternativo. La combinación de ambos iniciadores se considera la mejor opción de optimización (Taylor *et al.*, 2015).

Genes de referencia. Cinco genes de referencia o constitutivos se seleccionaron bibliográficamente debido a su condición altamente conservada en organismos eucariotas. Estos genes tienen expresión continua e independiente de una condición fitosanitaria (Cuadro 3). Posteriormente, se evaluó su viabilidad para normalizar la expresión de genes potencialmente asociados con resistencia adquirida bajo las condiciones experimentales de este trabajo. Para este fin se empleó el gen endógeno *CDR13*,

amounts of cDNA to implement simultaneous RT-qPCR with several primers related to multiple genes. It also reduces reagents and laboratory materials used for every sample. On the other hand, Oligo-dT is used in 40% of RT-qPCR trials, since it hybridizes to mRNA through the poly-A tail in comparison with an alternative random primer. However, the combination of both primer types is considered the best optimization option (Taylor *et al.*, 2015).

Reference genes. Five reference or housekeeping genes were bibliographically selected for their highly conserved condition in eukaryotic organisms. These genes have a continuous expression, independent to a phytosanitary condition (Table 3). We later evaluated its feasibility to normalize the expression of potentially associated genes with systemic acquired resistance under the experimental conditions of this investigation. For this purpose, the endogenous gene *CDR13* was used, which has been related to this type of resistance in citrus plants (Rawat *et al.*, 2017). The primers used to detect and quantify the transcribed product of this gene were F: CAAGCTGATATAATACCCAATATCGGAG, and R: GAGGCTCGCACTGCGT (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016).

RT-qPCR optimization. RT-qPCR was used to amplify and quantify the primary transcript (in its complementary cDNA form) of the five reference genes and the *CDR13* endogenous gene. This technique was performed on a C1000 Touch™ (Bio-Rad) equipment. For every gene, 20 and 10 μL of the final reaction volume were tested. Both mixtures contained 1X of SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (2X). For each primer, 200, 250 and 500 nM were evaluated, along with 50 ng of cDNA (Table 3). The configuration of the experiment consisted of three replications per sample obtained for each plant and the

Cuadro 3. Iniciadores empleados para amplificar el transcrito primario de cinco genes constitutivos de eucariotas seleccionados para evaluar su implementación como genes de referencia en un protocolo RT-qPCR para analizar la expresión génica inducida por la infección de CTV y CLas en *C. sinensis*/*C. aurantium*.

Table 3. Primers used to amplify the primary transcript of five eukaryotes housekeeping genes chosen to evaluate their implementation as reference genes in a RT-qPCR protocol to analyze the genic expression induced by the infection of CTV and CLas on *C. sinensis*/*C. aurantium*.

Gen	² Iniciador 5' - 3'	Función del gen	Referencia
<i>ACTINA</i>	F:CTGAGCGTGGCTA TTCCTTC R:GACTTCAGGACAG CGGAAAC	Regula la interacción entre filamentos de actina y otras fibras de proteínas que actúan como agentes de unión	Fu <i>et al.</i> , 2016
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>GAPDH</i>)	F:GGAAGGTCAAGAT CGGAATCAA R:CGTCCCTCTGCAA GATGACTCT	Produce la enzima que interfiere en óxido-reducción del proceso de glicólisis	Quiñones <i>et al.</i> , 1995 He <i>et al.</i> , 2006 Mafra <i>et al.</i> , 2013
<i>18S rRNA genes</i>	F:TTGGAAACTCTTT CGCCACT R:AGCAGACCTGGCT ATTATACGACTG	Producen la subunidad 18S del RNA ribosomal involucrado en la síntesis de proteínas	Quiñones <i>et al.</i> , 1995 He <i>et al.</i> , 2006 Yan <i>et al.</i> , 2012
Citocromo C Oxidasa (<i>COX</i>)	F:GTATGCCACGTCG CATTCCAGA R:GAATGCCCTTAGC AGTTTTGGCT	Sintetiza la enzima que cataliza la cadena de transporte de electrones de la unidad citocromo c- oxidasa a la molécula de oxígeno y es clave en la respiración celular	Quiñones <i>et al.</i> , 1995 He <i>et al.</i> , 2006 Li <i>et al.</i> , 2006
<i>F-BOX</i>	F:TTGGAAACTCTTT CGCCACT R:AGCAGACCTGGCT ATTATACGACTG	Genera la proteína relacionada con el reconocimiento de sustrato de la ubiquitina ligasa	Xu <i>et al.</i> , 2008 Mafra <i>et al.</i> , 2012 Chen <i>et al.</i> , 2018

²F: 'forward'; R:'reverse'

el cual se ha asociado con este tipo de resistencia en cítricos (Rawat *et al.*, 2017). Los iniciadores o cebadores empleados para detectar y cuantificar el producto transcrito de este gen fueron F: CA-AGCTGATATAATACCCAATATCGGAG, y R: GAGGCTCGCACTGCGT (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016).

Optimización de RT-qPCR. La técnica RT-qPCR se empleó para amplificar y cuantificar el transcri-

phytosanitary condition. Each replication was used to amplify the transcript of each reference gene and the endogenous gene. The same number of 'not target controls' were included for each primer. In total, the experiment included a total of 135 RT-qPCR tests. The amplification efficiency for each primer was evaluated with a dynamic range of $1 \times 10^3 - 1 \times 10^{-1}$ cDNA with a 1:10 dilution factor. Two thermocycling programs were evaluated: the first one consisted of denaturalization at 95 °C for

to primario (en su forma complementaria ADNc) de los cinco *genes de referencia* y del gen de endógeno *CDR13*, para lo cual se empleó el equipo C1000 Touch™ (Bio-Rad). Con fines de optimizar la técnica, por cada gen se probaron 20 y 10 µL de volumen final de reacción. Ambas mezclas contenían 1X de SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (2X). Así mismo, se evaluaron 200, 250 y 500 nM de cada iniciador y 50 ng de ADNc (Cuadro 3). La configuración del experimento consistió en tres replicas por cada muestra obtenida por planta y condición fitosanitaria. Cada replica se usó para amplificar el transcrito de cada gen de referencia y el gen endógeno. Se incluyó el mismo número de testigos negativos por cada iniciador. En total, el experimento consistió de 135 pruebas RT-qPCR. Se evaluó la eficiencia de amplificación de cada iniciador mediante un rango dinámico de 1×10^3 – 1×10^{-1} ADNc con factor de dilución 1:10. Se evaluaron dos programas de termociclaje: el primero consistió de desnaturalización a 95 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos 95 °C por 5 s y un gradiente de temperatura de anillamiento, para lo cual se evaluó el rango 57-60 °C por 30 s. El segundo programa incluyó desnaturalización a 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s y anillamiento a 57 °C por 40 s. Para ambos programas de amplificación se evaluaron tres rangos de temperatura para generar curvas de disociación con incrementos de 0.5 °C/ciclo: A) 70-85 °C; B) 60-95 °C, y C) 65-95 °C.

La forma de curva y valores bajos del umbral de amplificación (Ct) para cada muestra, así como la identificación de la temperatura óptima de disociación T_d mediante la conformación de un solo pico de amplificación fueron considerados para optimizar el protocolo RT-qPCR. Además de T_d , se verificó la amplificación específica de un simple fragmento esperado, sin la formación de dímeros, mediante electroforesis con gel de agarosa al 1.5% preparado en solución buffer TBE 1X, el cual fue sometido a

30 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s and an annealing temperature gradient in the range of 57-60 °C assessed for 30 s. The second program included denaturalization at 95 °C for 3 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s and annealing at 57 °C for 40 s. For both amplification programs, three temperature ranges were evaluated to generate melting curves with increases of 0.5 °C/cycle: A) 70-85 °C; B) 60-95 °C, and C) 65-95 °C.

The curve shape and low values of cycling threshold (Ct) per sample, as well as the identification of the optimum melting temperature (T_m) with the formation of only one amplification peak were considered to optimize the RT-qPCR protocol. In addition to T_m , the specific amplification of a single expected fragment was verified, without the formation of dimers, by electrophoresis with agarose gel at 1.5% prepared in a TBE 1X buffer solution and using 110 volts for 40 min. It was finally viewed in the UVP Bioimaging Systems photodocumenter.

The optimum multiplex RT-qPCR protocol included a final reaction volume of 10 µL with 500 nM per primer and 1X of SsoAdvanced Universal SYBR® Green. This configuration reduces the amount of primers without affecting the Ct or T_m . However, due to the accuracy required in the quantification, the use of probes may be another alternative to SYBR® Green. The thermal profile included initial denaturalization at 95 °C for 30 s, followed by 40 amplification cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s.

The T_m was estimated with the temperature related to the single peak of the melting curve for each primer of *GAPDH* (81°C), *F-BOX* (83.5) and *ACTIN* (84) transcripts (Figure 1A, B). The primer associated with *18S rRNA* gene produced a moderate peak at different temperatures for healthy plant samples and those infected with CTV and CLas, as opposed to what would be expected of

110 voltios durante 40 min. Finalmente se visualizó en el fotodocumentador UVP Bioimaging Systems.

El protocolo óptimo monoplex RT-qPCR incluyó un volumen final de reacción de 10 uL con 500 nM por iniciador y 1X de SsoAdvanced Universal SYBR® Green. Esto permite reducir la cantidad de reactivos sin afectar el Ct o T_d. Sin embargo, debido a la precisión requerida en la cuantificación el empleo de sondas puede ser otra opción al SYBR® Green. El perfil térmico elegido incluyó desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 s, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 5 s y 60 °C durante 30 s.

La T_d se estimó con la temperatura asociada al pico único de la curva de disociación para cada iniciador de los transcritos de *GAPDH* (81 °C), *F-BOX* (83.5) y *ACTINA* (84) (Figura 1A, B). El iniciador asociado al gen *18S rRNA* conformó un pico moderado a diferentes temperatura para las muestras vegetales sanas e infectadas con CTV y CLas contrario a lo que se esperaría de un gen de referencia (Figura 1B). En el caso de *COX* no se conformó una curva de disociación por lo que ambos se eliminaron para su posible uso como *genes de referencia*. El gen putativo de resistencia *CDR13* tuvo una T_d de 81 °C (Figura 1C). La curva de disociación con pico único indicó que no existen problemas de hibridación específica, concentración del iniciador o condiciones ineficientes de reacción del iniciador (Taylor *et al.*, 2015).

Las curvas de amplificación con los iniciadores asociados a *ACTINA* y *GADPH* mostraron Ct constantes entre 22.5-26 con 3500-4200 RFU (Unidades relativas de fluorescencia) para las muestras vegetales sanas e infectadas con CLas y CTV. (Figura 1D), mientras que el gen *F-BOX* presentó Ct entre 25-27 con similar RFU (Figura 1E). El iniciador relativo al gen *18S rRNA* tuvo Ct tardíos de 35-37 con 600 RFU (Figura 1E), congruente con la curva de disociación inadecuada, lo que confirmó

a *reference gene* (Figure 1B). In the case of *COX*, a melting curve was not produced, and therefore, they were both discarded for use as *reference genes*. Putative resistance gene *CDR13* had a T_m of 81 °C (Figure 1C). The single-peak melting curve indicated no problems regarding specific hybridization, primer concentration, or inefficient primer reaction conditions (Taylor *et al.*, 2015).

The amplification curves with the primers related to *ACTIN* and *GADPH* displayed Ct constants between 22.5-26 with 3500-4200 RFU (Relative fluorescence units) for the healthy plant samples and those infected with CTV and CLas (Figure 1D), whereas gene *F-BOX* displayed Ct between 25-27 with a similar RFU (Figure 1E). The primer related to *18S rRNA* gene had Ct's in the range of 35-37 with 600 RFU (Figure 1E), congruent with the inadequate melting curve, confirming its elimination. Contrary to expected, in all genes cases, samples of citrus infected with CTV showed the higher Ct's (25-27) followed by health samples (24-25), indicating possible infection effect on the expression of these genes. The amplification curve with the primer relative to *CDR13* gene had a 23 Ct for the three replicates (Figure 1F). The visualization in agarose gel of the fragments amplified per repetition was sampled with products obtained with the primers associated to *ACTIN* and *GADPH* genes. A simple band, without secondary products or dimers, confirmed the specificity of the primers used (Figure 1D).

RT-qPCR standard curve. The dynamic range was determined with four dilution factors, base 10 of cDNA (1x10³ – 1x10⁰ ng μL⁻¹), each with three replicates, in order to establish the optimum amount of cDNA required for the RT-qPCR reaction and to estimate the efficiency (E) (Taylor *et al.*, 2015). This process is illustrated with the primers related to *ACTIN* and *CDR13* genes (Figure 2A-

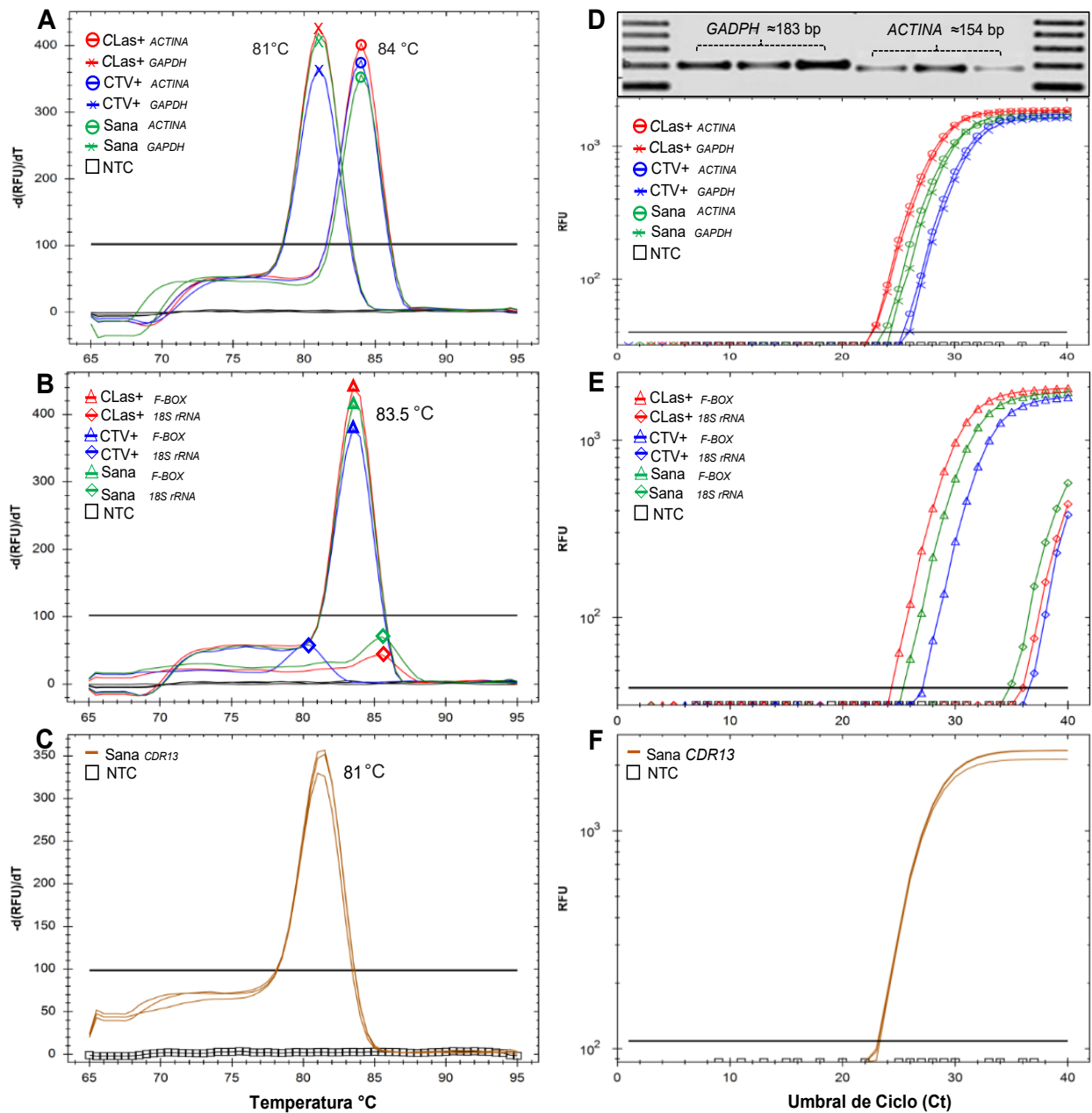


Figura 1. Curvas de disociación (A, B, C) y amplificación (D, E, F) por RT-qPCR empleando SYBR® Green para iniciadores de productos transcritos de los genes *GAPDH* y *ACTINA* (A, D), *F-BOX* y *18S rRNA* (B, E), y *CDR13* (C, F), en muestras foliares compuestas de *C. sinensis*/*C. aurantium* con tres condiciones fitosanitarias: sana (verde y café), positiva a CLas (rojo) y positiva a CTV (azul). Gel de agarosa al 1.5 % con fragmentos amplificados con iniciadores relativos a los genes *GAPDH* y *ACTINA* (D, recuadro superior).

Figure 1. Melting curves (A, B, C) and amplification curves (D, E, F) with RT-qPCR using SYBR® Green for primers targeting products transcribed from *GAPDH* and *ACTIN* (A, D), *F-BOX* and *18S rRNA* (B, E) and *CDR13* (C, F) gen using composed samples of leaves of *C. sinensis*/*C. aurantium* with three phytosanitary conditions: healthy (green and brown), positive to CLas (red) and positive to CTV (blue). Agarose gel at 1.5 % with amplified fragments with primers related to genes *GAPDH* and *ACTIN* (D, top section).

su eliminación. Contrario a lo esperado, en todos los genes' muestras de cítricos infectados con CTV exhibió los Ct's más tardíos (25-27) seguido por las muestras sanas (24-25), indicando posible efecto de la infección en la expresión de estos genes. La curva de amplificación con el iniciador relativo al gen *CDR13* tuvo un Ct de 23 para las tres repeticiones (Figura 1F). La visualización en gel de agarosa de fragmentos amplificados por cada repetición se muestra con productos obtenidos con los iniciadores asociados a los genes *ACTINA* y *GADPH*. Una banda simple, sin productos secundarios o dímeros, confirmaron la especificidad de los iniciadores empleados (Figura 1D).

RT-qPCR curva estándar. El rango dinámico se determinó con cuatro factores de dilución base 10 de ADNc (1×10^3 – 1×10^0 ng μL^{-1}), cada uno con tres repeticiones, para establecer la cantidad óptima de ADNc requerida para la reacción RT-qPCR y para estimar la eficiencia (E) (Taylor *et al.*, 2015). Este proceso se ilustra con los iniciadores relativos a los genes *ACTINA* y *CDR13* (Figura 2A-D).

Para estos genes, la concentración de ADNc tuvo una relación inversa con valores Ct (Figura 2 A, C), permitiendo ajuste a un modelo de regresión lineal simple con pendientes negativas de -3.33 ($r^2 = 0.99$) y -3.49 ($r^2 = 0.99$), y eficiencias (E) de 99.5 y 93.3 %, respectivamente. Con la línea ajustada, se determinó 1 ng μL^{-1} como umbral mínimo de concentración ADNc en la muestra vegetal para detectar la transcripción del gen *ACTINA* con Ct = 32-33 y de *CDR13* con Ct = 33.5-34 (Figura D, E). Las eficiencias de reacción estimadas estuvieron dentro del rango 90-110 % considerado aceptable (Taylor *et al.*, 2015). Estos resultados son ilustrativos del procedimiento por lo que el rango dinámico debe ser estimado por cada gen de interés ya que la expresión génica no es homogénea (Mafra *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012).

D). For these genes, the cDNA concentration had an inverse relation with Ct values (Figure 2 A, C), allowing the adjustment to a simple linear regression model with negative slopes of -3.33 ($r^2 = 0.99$) and -3.49 ($r^2 = 0.99$), and to estimate the efficiency (E) in 99.5 and 93.3 %, respectively. With the line adjusted, 1 ng μL^{-1} was established as the minimum cDNA concentration threshold required to detect the *ACTIN* transcription with Ct = 32-33 and of *CDR13* with Ct = 33.5-34 (Figure D, E). The estimated reaction efficiencies (E) were within the 90-110% range, considered acceptable (Taylor *et al.*, 2015). These results are illustrative of the procedure, therefore the dynamic range must be estimated for each gene of interest, since the genic expression is not homogenous (Mafra *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012).

Selection of reference genes. Based on the relative quantification obtained using the optimum RT-qPCR protocol, an analysis was carried out on the stability of the expression of *GAPDH*, *ACTIN* and *F-BOX* using the program CFX Manager™ ver 3.1 by Bio-Rad. *GAPDH* and *ACTIN* had the lowest M value (0.06), therefore the highest stability was achieved with 2.84 (ln 1/M). This indicates that expression of these genes had variability attributable mostly to the experimental process, but not to the infection by CLAs or CTV, which was expected from a *reference gene* (Figure 3). Nevertheless, $M < 0.5$ is considered acceptable for normalization purposes. Due to the synchrony of *GAPDH* and *ACTIN* (Figure 3), the use of both genes is recommended for normalization purposes. Mafra and collaborators (2012) evaluated a set of genes, including *ACTIN*, *GAPDH*, *F-BOX* and *18S rRNA* in different citrus species and rootstocks. They conclusively identified only *F-BOX* as the most stable. *18S rRNA* and *ACTB* genes have also been reported effective (Yan *et*

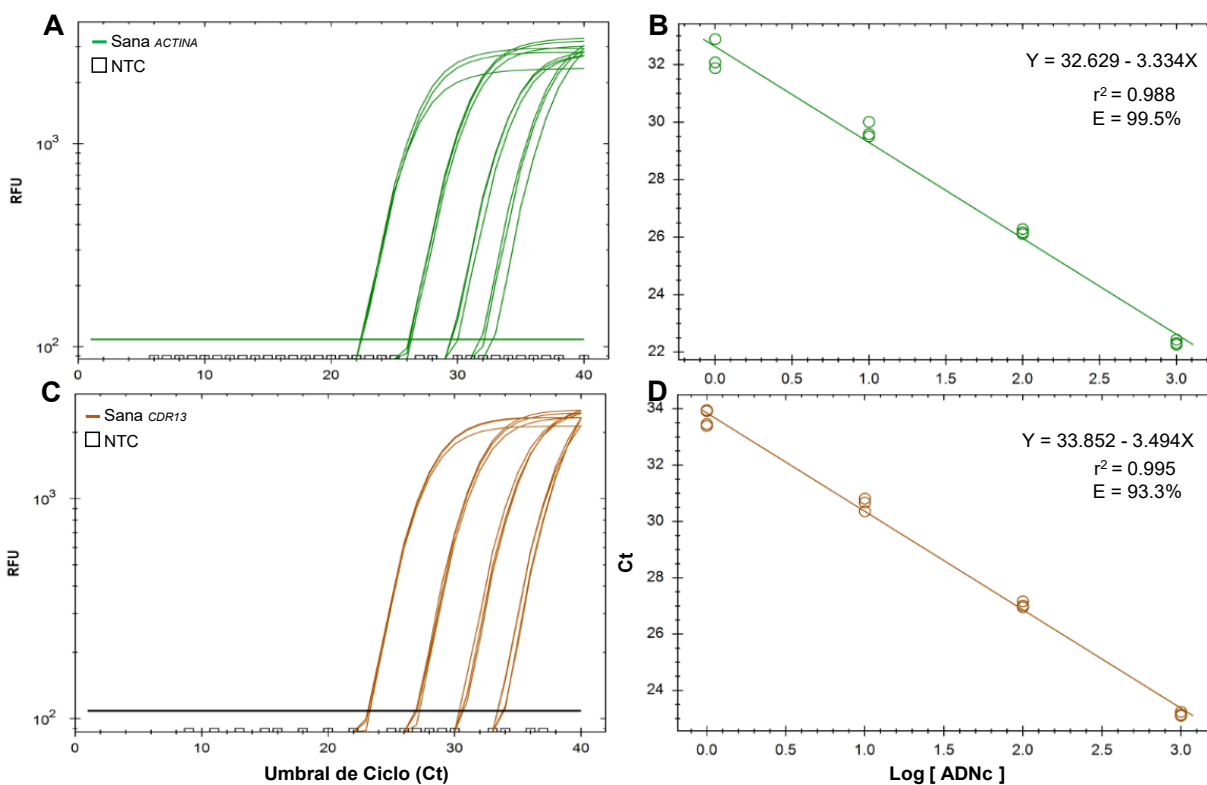


Figura 2. Curvas de estandarización y ajuste a un modelo de regresión lineal simple de las reacciones RT-qPCR obtenidas de cuatro factores de dilución (1×10^3 – 1×10^0) de ADNc empleado como template para iniciadores asociados a la expresión de *ACTINA* (A, B) y *CDR13* (C, D). E= eficiencia de la reacción.

Figure 2. Standardization curves and adjustment to a simple linear regression model of the RT-qPCR reactions obtained from four dilution factors (1×10^3 – 1×10^0) of cDNA used as a template for primers related to the expression of *ACTIN* (A, B) and *CDR13* (C, D). E= reaction efficiency.

Selección de genes de referencia. Con base en la cuantificación relativa obtenida con el protocolo RT-qPCR óptimo se procedió a analizar la estabilidad de la expresión de *GAPDH*, *ACTINA* y *F-BOX* mediante el programa CFX Manager™ ver 3.1 de Bio-Rad. *GAPDH* y *ACTINA* tuvieron el menor valor de M (0.059) por lo que tuvieron la mayor estabilidad con 2.84 ($\ln 1/M$). Esto indica que la expresión de estos genes tuvieron una variabilidad atribuible al proceso experimental pero no a la infección por CLAs o CTV lo cual era esperado para un *gen de referencia* (Figura 3). Sin embargo, $M < 0.5$ se considera aceptable efectos de normalización.

et al., 2012). These results indicate that the selection of *reference genes*, before a specific study of *systemic acquired resistance*, requires evaluation in the specific experimental conditions and with the biological material of interest. Likewise, it is crucial to optimize the RT-qPCR protocol with the designed or chosen primer(s), the plant sample and experimental goal (Taylor *et al.*, 2015). This investigation also identified the importance of standardizing the experimental units as much as possible, since the expressions of constitutive genes may be influenced by abiotic factors such as water stress and temperature.

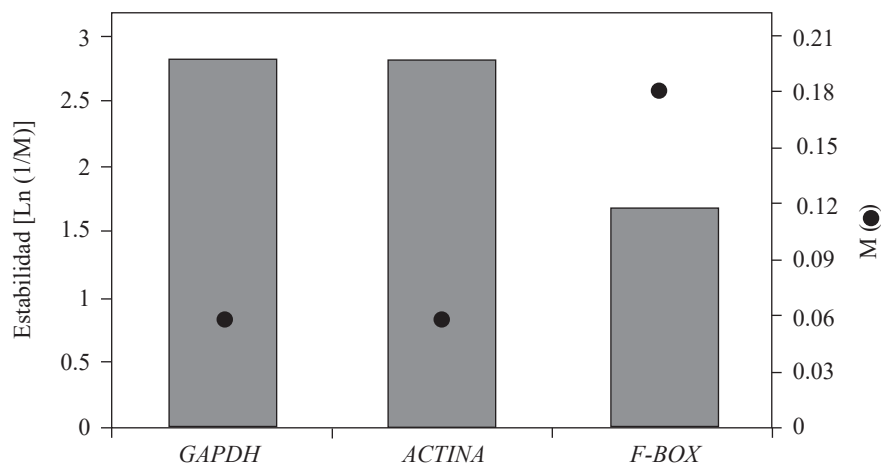


Figura 3. Estabilidad y promedio de variación de expresión entre pares de *genes de referencia* (M) obtenidos a partir de cuantificación por RT-qPCR de muestras de nervadura central de hojas de naranjo dulce (*C. sinensis/C. aurantium*) sanas e infectadas con CLAs y CTV.

Figure 3. Stability and average of expression variation between pairs of *reference genes* (M) obtained from quantifying by RT-qPCR central leaf nervation taken from orange trees (*C. sinensis/C. aurantium*), both healthy and infected with CLAs and CTV.

Por la sincronía de GAPDH y ACTINA (Figura 3), el empleo de ambos genes para fines de normalización son recomendables. Mafra y colaboradores (2012) evaluaron un conjunto de genes, entre los que se incluían *ACTINA*, *GAPDH*, *F-BOX* y *18S rRNA* en diferentes especies cítricas y porta injertos. Conclusivamente, identificaron únicamente a *F-BOX* como el más estable. También se han reportado a los genes *18S rRNA* y *ACTB* (Yan *et al.*, 2012). Estos resultados indican que la selección de *genes de referencia*, previo a un estudio específico de *resistencia genética adquirida*, requiere evaluarse en las condiciones experimentales y con el material biológico de interés. Adicionalmente, es fundamental optimizar el protocolo RT-qPCR con el iniciador(es) diseñado o elegido en función al tipo de muestra vegetal y objetivo experimental (Taylor *et al.*, 2015). En este trabajo también se identificó la importancia de estandarizar al máximo las unidades experimentales ya la expresión de genes constitutivos pueden ser influenciados por factores abióticos como estrés hídrico y temperatura.

In conclusion, an in-house, non-commercial RT-qPCR protocol was successfully developed to normalize the endogenous gene *CDR13*, associated with *systemic acquired resistance* in sweet orange. The *GAPDH*, *ACTIN* and *F-BOX* *reference genes* presented melting curves expressing no dimers formation, $Ct \leq 28$ and reaction efficiencies in the 90-110% range. However, *GAPDH* and *ACTIN* had the most stable genic expression (2.83) and are therefore proposed for the normalization of the expression of potentially endogenous genes in resistance studies of *C. sinensis/C. aurantium* in response to infections by CTV and CLAs under experimental conditions, analogous to those used in this investigation.

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

En conclusión, se desarrolló exitosamente un protocolo de laboratorio, no comercial, RT-qPCR para normalizar el gen endógeno *CDR13*, asociado con resistencia sistémica adquirida en cítricos. Los genes de referencia *GAPDH*, *ACTINA* y *F-BOX* exhibieron curvas de disociación sin expresión de dímeros,  $Ct \leq 28$  y eficiencias de reacción en el rango de 90-110%. Sin embargo, *GAPDH* y *ACTINA* tuvieron la expresión génica más estable (2.83) por lo que estos genes se proponen para normalizar la expresión de genes endógenos potenciales en estudios de resistencia de *C. sinensis*/*C. aurantium* en respuesta a la infección de CTV y CLAs en condiciones experimentales análogas a las de este estudio.

## LITERATURA CITADA

- Chen H, Palmer IA, Chen J, Chang M, Thompson SL, Liu F and Fu Z Q. 2018. Specific and accurate detection of the citrus greening pathogen *Candidatus Liberibacter* spp. using conventional PCR on citrus leaf tissue samples. *Journal of Visualized Experiments* 136: e57240. <https://dx.doi.org/10.3791/57240>
- Dawson W, Bar-Joseph M, Garnsey S and Moreno P. 2015. *Citrus Tristeza Virus*: Making an ally from an enemy *Annual Review of Phytopathology* 53: 137-155. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
- Domínguez-Monge S, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, Gutiérrez-Espinosa MA, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Ochoa-Martínez D, Febres V, Hernández-Nava G, y Martínez-Bustamante V. 2014. Epidemiología molecular de aislamientos de Citrus Tristeza Virus de la Península de Yucatán. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(Suplemento): S46. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Esquivel-Chávez F, Mora-Aguilera G, Velázquez-Monreal J, Valdovinos-Ponce G, Gutiérrez-Espinosa MA y Loeza-Kuk E. 2015. Análisis morfo-anatómico de *Citrus aurantifolia* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus* e injertado en tres patrones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(Suplemento): S199. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ., Manzanilla-Ramírez MA y Flores-Sánchez J. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas asociados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n8/v46n8a3.pdf>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2015. Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 33(2): 195-210. <https://www.rmfmf.org.mx/Vol3322015/AC/AC5.pdf>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal J J, Domínguez-Monge S, Bassanezi R B, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101:1129-1127. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- 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* 11(17):394. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>
- Green MR and Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 4th ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2028p.
- Gutiérrez-Espinosa MA, Luth D and Moore GA. 1997. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Plant Cell Reports* 16: 745-753. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002990050313>
- He C, Molena A, Xiong X, Boit G and Nie X. 2006. Cytochrome c oxidase mRNA as an internal control for detection of *Potato virus Y* and *Potato leafroll virus* from single aphids by a co-amplification RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 138 (1-2):152-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.007>
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66(1):104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Loeza-Kuk E, Gutiérrez-Espinosa MA, Ochoa-Martínez D, Villegas-Monter A, Mora-Aguilera G, Palacios-Torres EC y Pérez-Molphe-Balch E. 2011. Análisis de la resistencia en pomelo y limón mexicano transformados con el gen p25 del *Citrus tristeza virus*. *Agrociencia* 45 (1):55-65. ISSN 2521-9766 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30219760006>
- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM and Machado MA. 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *Plos One* 7(2): e31263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031263>
- Mafra V, Martins P, Francisco C, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J and Machado M. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics* 14(1):247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>
- Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE y Mora-Aguilera G. 2020. Epidemiología regional de Citrus tristeza virus en Veracruz. *Revista*



- Mexicana de Fitopatología 38(Suplemento): S131. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento382020.html>
- Martínez-Bustamante V, López-Bautista V, Alanís-Martínez I, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Loeza-Kuk E, Robles-García P y Esquivel-Chávez F. 2015. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el dosel de naranjo (*Citrus sinensis*), con infección asintomática. Revista Mexicana de Fitopatología 33(Suplemento): S201. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JL, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A and Loeza-Kuk E. 2014a. Current situation and perspectives for management of Citrus HLB. Mexican Journal of Phytopathology 32(2): 108-119. [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2\\_03.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf)
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez F, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salín C, Flores-Olivas A, González-Gómez R y Robles-García P. 2014b. Epidemiological surveillance and current status of coconut lethal yellowing, potato purple top and citrus huanglongbing (HLB) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 32(2): 120-131. [https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2\\_04.pdf](https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_04.pdf)
- Quiñones V, Zanlungo S, Holuigue L, Litvak S and Jordana X. 1995. The Cox1 initiation codon is by RNA editing in potato mitochondria. Plant Physiology 108(3): 1327-1328. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.3.1327>
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan Y, Bowman KD, Gmitter FG 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 4: 17064. <http://dx.doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Rivas-Valencia P, Loeza-Kuk E, Mora-Aguilera G, Ruiz-García N, Ochoa-Martínez D, Gutiérrez-Espinosa A y Febres V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del Citrus tristeza virus de Yucatán y Tamaulipas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1(4): 493-507. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v1n4/v1n4a4.pdf>
- Rivera-López S, Perales-Salvador A, Del Valle-Sánchez M y Caamal-Cauich I. 2020. Panorama de la producción y comercialización de naranja en México. Agro Productividad 13(7): 9-14. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1614>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal J, Manzanilla-Ramírez AM, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas de Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm] Swingle) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1):15-31. <https://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2012.01.005>
- SIAP. 2019. Panorama agroalimentario 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en línea en: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019)
- Soares JM, Tanwir SE, Grosser JW and Dutt M. 2020. Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and huanglongbing. Tropical Plant Pathology 45: 237-250. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00362-9>
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M and Nguyen M. 2015. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA. 94547. Bulletin 5859. [https://www.bio-rad.com/literature/Bulletin\\_5859](https://www.bio-rad.com/literature/Bulletin_5859)
- Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-Paz A. 2019. Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLas and CTV. Mexican Journal of Phytopathology 37(3):399-420. <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1906-6>
- Xu G, Ma H, Nei M and Kong H. 2008. Evolution of *F-Box* genes in plants in plants: Different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(3): 835-840. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812043106>
- Yan J, Yuan F, Long G and Deng Z. 2012. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. Molecular Biology Reports 39(2): 1831-1838. <https://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-0925-9>