



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

**EXPRESIÓN DE GENES EN NARANJO  
DULCE (*Citrus sinensis*) INOCULADO  
CON *Candidatus Liberibacter asiaticus***

ROSA ISELA TRIANA GUTIÉRREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: Expresión de genes en naranja dulce (*Citrus sinensis*) inoculado con *Candidatus Liberibacter asiaticus*

realizada por el (la) alumno (a): Rosa Isela Triana Gutiérrez

bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FRUTICULTURA

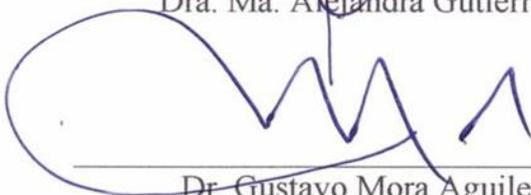
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa

ASESOR



\_\_\_\_\_  
Dr. Gustavo Mora Aguilera

ASESORA



\_\_\_\_\_  
Dra. Raquel Cano Medrano

# EXPRESIÓN DE GENES EN NARANJO DULCE (*Citrus sinensis*) INOCULADO CON *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Rosa Isela Triana Gutiérrez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2020

## RESUMEN

Para determinar la expresión diferencial de genes en naranjo dulce (*Citrus sinensis*/*Citrus aurantium*), inoculado con dos cepas de inducción patogénica contrastante de CLas (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) y como testigo comparativo, una cepa T30 de CTV (*Citrus tristeza virus*), se desarrolló a partir de extracción total de ARN de nervadura central de hoja de naranjo dulce positiva a CLas y CTV un protocolo de RT-qPCR no comercial, empleando *GAPDH* y *Actin* como genes de referencia. Los resultados de RT-qPCR revelaron que la inoculación indujo diferente expresión de genes en respuesta a *Candidatus Liberibacter asiaticus* cepa asintomática (CLas-A), CLas sintomática (CLas-S) y CTV en condiciones de invernadero. En hojas periódicamente muestreadas, la infección se confirmó por qPCR a partir de 3.5 meses después de inoculación (MDI) con CTV, 4.5 MDI y 6 MDI con CLas-S y CLas-A, respectivamente. Con lo anterior se evidenció una rápida infección de CTV comparada con la infección de ambas cepas de CLas. Las plantas inoculadas con CLas-A al tiempo 6 MDI registraron el mayor valor de la expresión de *TIB-NBS-LRR* (1.37), seguida por la expresión de *WRKY70* (0.88) mientras que los genes *PP2-B13*, *NB-ARC* y *CDR13* mostraron valores de expresión menores (0.44, 0.52, 0.4 respectivamente). Las plantas inoculadas con CTV vuelven a presentar los mayores valores de expresión en todos los genes que las inoculadas con cualquiera de los dos inóculos de CLas *TIB-NBS-LRR* (2.06), *WRKY70* (1.35), *PP2-B13* (1.12), *NB-ARC* (1.88) y *CDR13* (3.17). Podemos decir que bajo las presentes condiciones experimentales la expresión diferencial de los genes que induce CLas-A está contribuyendo a la condición asintomática de las plantas de naranjo inoculadas, induciendo la sobreexpresión de todos los genes. La diferencia entre plantas inoculadas con CLas-A y plantas inoculadas con CLas-S a 6 MDI es la sobreexpresión de los cinco genes en el primero y la reducción en la expresión en el segundo. A los 12 MDI los valores disminuyen al inocular con CLas-A y se mantienen al inocular con CLas-S.

La expresión de los genes *TIB-NBS-LRR* ( $p=0.06$ ) y *NB-ARC* ( $p=0.02$ ), asociadas a de proteínas ricas en leucina, en respuesta a los agentes patógenos en plantas con CLas-S se expresan hasta 12

MDI. Mientras que en CLas-A ( $p=0.01$ ) la expresión fue a los 6 MDI, principalmente de *WRKY70* activador de otros genes de defensa dependientes de ácido salicílico. La mayor regulación de *CDR13* ( $p=0.06$ ), putativamente relacionado a resistencia a enfermedades constitutivas, fue en CTV. La regulación de *PP2-B13*, relacionada con la proteína del floema, para CLas-S fue baja ( $p=0.28$ ) contrario a CTV ( $p=0.06$ ).

**Palabras clave adicionales:** RT-qPCR, *TIB-NBS-LRR*, *WRKY70*, *PP2-B13*, CLas, CTV.

**GENE EXPRESSION IN SWEET ORANGE (*Citrus sinensis*) INOCULATED WITH  
*Candidatus Liberibacter asiaticus***

Rosa Isela Triana Gutiérrez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2020

**ABSTRACT**

To determine the differential expression of genes in sweet orange tree (*Citrus sinensis* / *Citrus aurantium*), inoculated with two contrasting pathogenic induction strains of CLAs (*Candidatus Liberibacter asiaticus*), and as a comparative control, a T30 of CTV (*Citrus tristeza virus*) was used. Developed from total extraction of CLAs positive and CTV positive leaf midrib RNA a non-commercial protocol, of RT-qPCR using as reference gene: *GAPDH* and *Actin*. The RT-qPCR results revealed that inoculation induced different gene expression in response to asymptomatic *Candidatus Liberibacter asiaticus* strain (CLas-A), symptomatic CLAs (CLas-S) and CTV under greenhouse conditions. In sampled leaves, the infection confirmed by qPCR at 3.5 months after inoculation (MDI) for CTV, for CLas-S at 4.5 MDI and CLas-A at 6 MDI, these data evidenced rapid infection compared to infection by both strains of CLAs.

The RT-qPCR results revealed that inoculation induced different gene expression in response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* asymptomatic strain (CLas-A), symptomatic CLAs (CLas-S), and CTV under greenhouse conditions. In periodically sampled leaves, the infection was confirmed by qPCR starting 3.5 months after inoculation (MDI) with CTV, 4.5 MDI, and 6 MDI with CLas-S and CLas-A, respectively. With the above, a rapid CTV infection was evidenced compared to the infection of both CLAs strains. Plants inoculated with CLas-A at time 6 MDI recorded the highest value of the expression of *TIB-NBS-LRR* (1.37), followed by the expression of *WRKY70* (0.88) while the genes *PP2-B13*, *NB-ARC*, and *CDR13* showed lower expression values (0.44, 0.52, 0.4 respectively). Plants inoculated with CTV once again show the highest expression values in all genes than those inoculated with either of the two inoculants of CLAs *TIB-NBS-LRR* (2.06), *WRKY70* (1.35), *PP2-B13* (1.12), *NB-ARC* (1.88) and *CDR13* (3.17). We can say that under the present experimental conditions the differential expression of the genes that induces CLas-A is contributing to the asymptomatic condition of the inoculated orange plants, inducing the overexpression of all the genes. The difference between plants inoculated with CLas-A, and plants inoculated with CLas-S at 6 MDI is the overexpression of the five genes in the first

and the reduction in the expression in the second at 12 MDI, the values decrease when inoculating with CLas-A and are maintained when inoculating with CLas-S the expression of the genes *TIB-NBS-LRR* ( $p = 0.06$ ) and *NB-ARC* ( $p = 0.02$ ), associated with proteins rich in leucine, in response to pathogens in plants with CLas-S are expressed up to 12 MDI. While in CLas-A ( $p = 0.01$ ) the expression was at 6 MDI, mainly of *WRKY70* activator of other defense genes dependent on salicylic acid. The highest regulation of *CDR13* ( $p = 0.06$ ), putatively related to resistance to constitutive diseases, was in CTV. The regulation of *PP2-B13*, related to the phloem protein, for CLas-S was low ( $p = 0.28$ ) contrary to CTV ( $p = 0.06$ ).

**keywords:** RT-qPCR, *TIB-NBS-LRR*, *WRKY70*, CLas, CTV

## **AGRADECIMEINTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el financiamiento y apoyo otorgado para llevar a cabo esta investigación y estudio.

Al **Colegio de Postgraduados**, al departamento de fruticultura por la oportunidad presentada para el desarrollo de académico y habilidades profesionales.

A la **Dra. Alejandra Gutiérrez**, mi profundo agradecimiento por su disposición, por todo su apoyo, su experiencia, su confianza y aportaciones dedicadas a la presente investigación.

A la **Dra. Raquel Cano Medrano**, por su apoyo y por sus valiosas observaciones durante la realización de la investigación.

Al **Dr. Gustavo Mora Aguilera** por su tolerancia, sus valiosas aportaciones y su experiencia para fortalecer este trabajo.

Al equipo **LANREF-CP**, por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, a Juan, Gerardo por su apoyo y disposición para resolver mis dudas y en especial al área molecular a Vero, Gabo, Adri, Yuri y Viri, por compartir sus conocimientos, por su apoyo incondicional y por sobre todo su amistad.

## DEDICATORIAS

*A mi padre Dios, por darme la oportunidad y fuerza para culminar mis estudios.*

*A mis padres Martha y José, por su amor, cariño y apoyo incondicional, por todas sus enseñanzas y consejos.*

*A mis hermanas Margarita, Sofí, Mariana, Moni, Carmen y hermanos Daniel y Roge, por su apoyo y confianza.*

*A mis Cuñados y sobrinos que siempre han estado a mi lado apoyándome, procurando compartir momentos especiales.*

*A Yuli, Gaby, Aby, por tantos años de amistad, porque la vida nos ha puesto en caminos diferentes, pero siempre han estado a mi lado apoyándome en cada una de las etapas que he vivido y a Jesahi por todo lo que me enseñaste gracias.*

*A Ross, Mariana y Arely, por hacer la estancia en el colegio más agradable*

*A las familias: Hidalgo, Maldonado Triana y L-Lechuga, porque con su amistad y compañía me siento en familia.*

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVO</b> .....	3
<b>HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
Naranja.....	3
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	4
<i>Citrus Tristeza Virus</i> .....	7
Interacción Planta-Patógeno.....	9
Usos de análisis genómicos.....	13
Técnicas de análisis genómicos .....	15
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	16
<b>CAPÍTULO I. VALIDACIÓN DE RT-qPCR PARA ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN <i>Citrus sinensis</i> CON CLas O CTV</b> .....	24
1.1 <b>RESUMEN</b> .....	24
1.2 <b>ABSTRACT</b> .....	25
1.3 <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	26
1.4 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
<b>Material vegetal</b> .....	27
<b>Extracción de ARN</b> .....	28
<b>Retrotranscripción</b> .....	28
<b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real; genes de referencia</b> .....	29
<b>Estandarización de qPCR</b> .....	30
<b>Protocolo de amplificación</b> .....	31
<b>Curvas de disociación</b> .....	31
1.5 <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31

<b>Cuantificación y calidad de ARN</b> .....	31
<b>Retrotranscripción</b> .....	32
<b>Validación de la qPCR, determinación de condiciones de reacción</b> .....	33
<b>Curvas de disociación</b> .....	33
<b>Eficiencia de la qPCR</b> .....	34
<b>Gen de referencia</b> .....	36
1.6 CONCLUSIONES .....	37
1.7 LITERATURA CITADA.....	38
<b>CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN NARANJO DULCE (Citrus</b>	
<b>sinensis) EN RESPUESTA A CLas</b> .....	44
2.1 RESUMEN.....	44
2.2 ABSTRACT.....	45
2.3 INTRODUCCIÓN .....	46
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
<b>Localización del experimento</b> .....	49
<b>Material vegetal</b> .....	49
<b>Inoculación</b> .....	49
<b>Tratamientos</b> .....	49
<b>Muestreos y variables a evaluar</b> .....	51
<b>Extracción de ácidos nucleicos</b> .....	51
<b>Corroboración de infección</b> .....	51
<b>Síntesis de ADNc</b> .....	52
<b>Detección de expresión de genes</b> .....	52
<b>RT-qPCR</b> .....	53
<b>Determinación de los cambios en la expresión génica</b> .....	53
<b>Análisis estadístico</b> .....	54
2.5 RESULTADOS .....	54
<b>Detección del patógeno en material injertado</b> .....	54
<b>Comparación de la expresión diferencial de los genes mediante el análisis de la</b>	
<b>expresión  normalizada (<math>\Delta\Delta Cq</math>) de los genes en el tiempo</b> .....	54

Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) de la expresión de los genes en relación al tiempo eliminado los genes de referencia.....	59
Comparación de la expresión de los genes entre la fuente de inóculo en el mismo tiempo mediante la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ).....	63
2.6 DISCUSIÓN.....	68
<b>Método de análisis</b> .....	68
<b>Expresión (<math>\Delta\Delta Cq</math>) de los genes en el tiempo</b> .....	68
<b>Expresión (<math>\Delta\Delta Cq</math>) de los genes entre inóculos</b> .....	71
2.7 CONCLUSIONES .....	74
2.8 LITERATURA CITADA.....	77
CONCLUSIONES GENERALES.....	83
APÉNDICE.....	85

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. A) Gel de agarosa al 1.5 % fragmentos amplificados de aproximadamente 200pb, amplificación por qPCR empleando SYBR® Green para los genes *GAPDH* (verde), *F-Box* (azul), *Actin* (rosa), *18S ARNr* (morado). B) Curva de disociación. C y D) Temperatura melt para genes *GAPDH*, *F-Box*, *Actin*, *18S ARNr* y *CDR13*, en tres plantas por cada condición fitosanitaria estudiada. .... 34
- Figura 1.2. A y C) Curvas amplificación por qPCR de las muestras estándar  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^0$  de ADNc total para el gen *Actin* (*Act3*) y *CDR13*. B y D) Curva estándar con valores de eficiencia, R<sup>2</sup> y pendiente (slope) para ambos genes. .... 36
- Figura 1.3. Agrupamiento de genes candidatos para emplearse como referencia, en relación a la estabilidad presentada en hojas de naranjo dulce bajo tres condiciones fitosanitarias: sanas, positivas a CLas y CTV..... 37
- Figura 2.1. Ubicación de las plantas en jaulas, injerto enchapado lateral e injerto de yema en planta de naranjo dulce. .... 51

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Reactivos y volumen por ensayo para el primer paso de retrotranscripción (RT), mix de reacción (1X) en $\mu\text{L}$ .....	28
Cuadro 1.2. Mezcla de reacción empleada para el segundo paso de la retrotranscripción (RT) en $\mu\text{L}$ .....	28
Cuadro 1.3. Genes constitutivos de eucariotas, candidatos a genes de referencia para estudios de expresión génica usados en este estudio. ....	30
Cuadro 1.4. Cantidad y calidad de ácidos nucleicos totales obtenidos de nervadura en hojas de <i>Citrus sinensis</i> . ....	32
Cuadro 2.1. Condiciones en la conformación de los tratamientos de las plantas de naranjo dulce empleadas en esta investigación.....	50
Cuadro 2.2. Primer específicos de los cinco genes de interés elegidos para RT-qPCR (Fu <i>et al.</i> , 2016). ....	52
Cuadro 2.3. Análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta\text{Cq}$ ) de cinco genes usando tres repeticiones biológicas en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación. ....	55
Cuadro 2.4. Análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta\text{Cq}$ ) de cinco genes eliminando el valor atípico en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos en diferentes tiempos. ....	57
Cuadro 2.5. Análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta\text{Cq}$ ) de cinco genes en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos en diferente tiempo usando un valor corregido. ....	58
Cuadro 2.6. Análisis de la expresión de genes mediante la cuantificación relativa ( $\Delta\text{Cq}$ ) de cinco genes usando tres repeticiones biológicas en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación. ....	59
Cuadro 2.7. Análisis de la expresión de genes mediante la cuantificación relativa ( $\Delta\text{Cq}$ ) de cinco genes usando dos repeticiones biológicas eliminando el valor atípico en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación. ....	61

Cuadro 2.8. Análisis de la expresión de genes mediante la cuantificación relativa ( $\Delta Cq$ ) de cinco genes usando los datos corregidos en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación. ....	62
Cuadro 2.9. Comparación de la expresión de cinco genes entre tres inóculos en el mismo tiempo mediante el análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ).....	65
Cuadro 2.10. Comparación de la expresión de cinco genes entre tres inóculos en el mismo tiempo mediante el análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) eliminado el valor atípico.....	66
Cuadro 2.11. Comparación de la expresión de cinco genes entre tres inóculos en el mismo tiempo mediante el análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) usando un valor corregido. ....	67

## INTRODUCCIÓN

El HLB o Huanglongbing es una enfermedad que ha causado graves daños a la industria cítrica mundial, ya a que acorta la vida útil de la planta y ocasiona la reducción de la calidad de la fruta y jugo. El patógeno causante de la enfermedad es la bacteria *Candidatus Liberibacter americanus* (CLAs), es transmitida por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Halberth y Manjunath, 2004) y mediante material vegetativo infectado. La problemática reside en que la principal forma de detección en campo se da por la sintomatología, ya que las primeras etapas infectivas en árboles de cítricos infectados por HLB presentan bajos títulos de la bacteria. Uno de los principales factores que contribuyen a la rápida propagación de CLAs es la falta de resistencia natural de hospederos (da Graça *et al.*, 2015). Las estrategias de control actuales se centran en la presencia del vector y/o presencia de síntomas, que generalmente inician cuando los árboles se vuelven sintomáticos, desde 3 meses hasta varios años después de la infección inicial (Esquivel, 2014; Lee *et al.*, 2015). El desarrollo de los síntomas de HLB considera la consecuencia de una serie de cambios celulares, fisiológicos y moleculares y también puede estar asociado con la respuesta de defensa del huésped (Boava *et al.*, 2017). CLAs tiene un largo período de incubación, los patógenos en la planta a menudo tienen títulos bajos y la distribución de la bacteria en la planta, así como en la fruta y hojas de los naranjos “Valencia” es irregular (Ramadugu *et al.*, 2016; Hui-Ling y Burns, 2012) lo que dificulta su detección. La menor expresión de los genes implicados en la funcionalidad del floema en plantas resistentes y tolerantes, puede explicar parcialmente la ausencia de síntomas de enfermedad, asociados con la acumulación de almidón que generalmente se observan en genotipos susceptibles al HLB, la cual se asocia con la expresión de síntomas, particularmente en limón mexicano (*C. aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*) (Boava *et al.*, 2017; Esquivel-Chávez *et al.*, 2016).

El desafío actual asociado con la mitigación del *Candidatus Liberibacter asiaticus* en campo, así como la estacionalidad del fitopatógeno y la detección de los síntomas asociados de la enfermedad, hace complejo el control y detección de la enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Estudios en los que se comparan diferentes cítricos infectados y sanos, cítricos levemente resistentes versus tolerantes sugieren que el patógeno modula diferencialmente la expresión de genes clave que pueden estar involucrados en la tolerancia a la enfermedad (Mafra *et al.*, 2013). Existen algunos esfuerzos para entender los mecanismos de respuesta de la planta para una eventual aplicación en

el desarrollo de resistencia por, ejemplo de ellos es el estudio de Kim *et al.* (2009), mediante análisis de microarrays evaluó la respuesta de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) a la infección por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, y encontró que la infección por HLB afectaba significativamente a la expresión de 624 genes cuyas proteínas codificadas se clasificaban según su función. Así mismo, los análisis anatómicos indicaron que la infección por bacterias HLB causó la interrupción del floema, la acumulación de sacarosa y obstrucción de elementos cribosos. La regulación positiva de tres genes clave de la biosíntesis de almidón, probablemente contribuyeron a la acumulación de almidón en las hojas afectadas por HLB. El bloqueo del floema asociado a HLB resultó de la obstrucción de los tubos cribosos en lugar de los agregados bacterianos ya que *Candidatus Liberibacter asiaticus* no forma agregados en cítricos. La regulación del gen PP2 está relacionada con la deposición de calosa para taponar los poros en plantas afectadas por HLB. La acumulación de calosa se vinculó y se correlacionó con los genes implicados en la funcionalidad del floema y la acumulación de almidón, se vinculó con la regulación al alza de los genes implicados en la biosíntesis del almidón y la represión de los relacionados con la descomposición del almidón (Kim *et al.*, 2009; Boava *et al.*, 2017).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos constantes por evitar y mitigar pérdidas a la citricultura, la dispersión de CLas ha sido inevitable, por lo que se siguen buscando alternativas para el control de la bacteria (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; da Graça *et al.*, 2015). Como parte de la supervisión en campo de la enfermedad, a finales del 2013, se detectaron dos árboles positivos a CLas sin expresión de síntomas condición no previamente reportada en México y otros países (DGSV-CP-LANREF, 2015). El estudio de esta condición parasítica es fundamental para comprender mecanismos de resistencia en la planta en respuesta a la infección de CLas. El empleo de estrategias genómicas, en particular la transcriptómica direccionada a genes que previamente se han analizado en diferentes experimentos con cítricos en el mundo (da Graça *et al.*, 2015), se postula como una alternativa rápida para analizar el efecto diferencial de genes en CLas-asintomático. La inclusión de CTV, variante moderada (asintomático) tipo T30 puede ser un referente comparativo. Este conocimiento puede ser fundamental para su posterior uso en programas de ingeniería genética activando la expresión de genes endógenos a los cítricos.

## **OBJETIVO**

Estudiar la expresión de los genes endógenos *TIR-NBS-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY13*, *CDR13* y *PP2-B13* en respuesta a la infección de cepas de CLas asintomática (CLas-A) y sintomática (CLas-S) en naranjo dulce/naranjo agrio (*Citrus sinensis*/ *Citrus aurantium*) en condiciones de invernadero.

## **HIPÓTESIS**

- La expresión del gen relacionado con la proteína del floema (*PP2-B13*), los relacionados con la ruta metabólica del acetil salicílico (*CDR13* y *WRKY70*), los genes relacionados con la síntesis de proteínas con repeticiones ricas en leucina (*TIR-NBS-LRR* y *NB-ARC*) ambas asociadas a la respuesta a los agentes patógenos, se expresan en mayor cantidad en *Citrus sinensis*/*C. aurantium* en infecciones sistémicas y multiplicación microbiana en floema causada por cepas asintomáticas de CLas.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Naranjo**

La citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, por ser fuente de divisas y empleo en los procesos de producción, cosecha, empaque, comercialización e industrialización. En México el mayor aporte en volumen se da por el naranjo (*Citrus sinensis* L.) dentro de la industria citrícola. Según el reporte del SIAP (2019), se tuvo una producción de 4.7 millones de toneladas, por lo que el país se ubica como el cuarto productor a nivel mundial. De la superficie frutícola, el naranjo es el cítrico más importante por su extensión, con 340 mil hectáreas en 2018 y rendimientos promedio de cosecha de 13.95 toneladas por hectárea. En cuanto al ranking producción nacional, el estado de Veracruz aporta el 46.2%, mientras que Tamaulipas y Nuevo León, aportan el 12.7 y 10 %, respectivamente (SIAP, 2019).

El naranjo dulce como todos los cítricos se propaga mediante injerto sobre un portainjerto, debido a que éste confiere ciertas características a la variedad, tales como: resistencia a enfermedades y plagas, resistencia a diferentes tipos de estrés fisiológico, disminución del período juvenil de los árboles, desarrollo vegetativo del árbol, calidad del fruto, entre otros (Rocha-Peña, 2009). El naranjo amargo (*C. aurantium*) había sido el portainjerto más empleado, pues confiere excelentes cualidades a la variedad, hasta la aparición de *Citrus tristeza virus* (al cual es muy susceptible), razón por la que se restringió su uso como portainjerto a limón (*C. aurantifolia*

Swingle) exclusivamente (Amorós, 2003). El portainjerto naranjo agrio es tolerante a exocortis (*Citrus exocortis viroid*- citrus, CEVd-cit), psoriasis (*citrus psorosis virus* - CPsV) y xylopososis o también llamada caquexia (*Hop stunt viroid* – [HpSVd-cit]) e induce buena productividad y calidad de fruto con todas las variedades de naranjo y mandarino (Agustí, 2003). Los cítricos son reproducidos clonalmente, por lo que la posibilidad de identificar una resistencia significativa entre los cultivares de cítricos comerciales comunes es muy improbable (Folimonova *et al.*, 2009), por lo que la búsqueda de material con sintomatología mínima o atenuada es una tarea importante para la producción de naranjo y otros cítricos.

### ***Candidatus Liberibacter asiaticus***

Actualmente la enfermedad Huanglongbing (HLB) es conocida también como reverdecimiento de los Cítricos o Dragón Amarillo y "Citrus Greening", es una de las enfermedades que ha tomado mayor importancia en las zonas citrícolas debido a las pérdidas que provoca. Los primeros registros que se tienen de la enfermedad datan de 1919 en el sur de China (Bové, 2006, Zheng *et al.*, 2018). Es una enfermedad que afecta diversas especies de plantas del género *Citrus* y afecta severamente al naranjo dulce (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y cítricos agrios, como lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y lima persa (*Citrus latifolia*). Sin embargo, muchas otras especies de cítricos pueden manifestar síntomas en diferentes niveles de expresión (FAO, 2013). El HLB se ha distribuido hacia áreas citrícolas de Asia y África, donde ha causado graves daños a la industria, debido a que acorta la vida útil de la planta a menos de diez años y ocasiona la reducción de la calidad de la fruta y jugo. En 2013, la Secretaria de Agricultura en México, reportaba su presencia en varios estados de la República como Quintana Roo, Yucatán, Michoacán, Colima y Sinaloa, a pesar que se procuraron medidas cuarentenarias para evitar que la enfermedad se propagara hacia otras zonas productoras, el estatus fitosanitario del HLB, hasta el mes de marzo de 2018 reportó su presencia en 24 estados de la República Mexicana en material vegetal. Asimismo, se ha reportado recientemente la detección del vector (*Diaphorina citri* Kuwayama) infectivo en los estados de Coahuila y Sonora (SENASICA-SIRVEF, 2020).

El agente causal es la bacteria Gram-negativa restringida al floema, no cultivable, perteneciente al género *Candidatus Liberibacter* (Bové, 2006). Hasta el 2013 se conocían tres variantes: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (FAO, 2013). Para el 2015, se reportó en The

American Phytopathological Society una variante que se denominó: *Candidatus Liberibacter caribbeanus* (CLca) en naranjo (*Citrus sinensis*) en la región noreste de Colombia, América del Sur. En 2020, Attaran y colaboradores describieron un ensayo que permitió la replicación de ADN de CLas en tejido vegetal de cítricos inoculados en condiciones fisicoquímicas y nutricionales específicas, avanzando en el cultivo de la bacteria en condiciones de laboratorio.

En México el primer reporte de HLB se registró en 2009, en los Estados de Yucatán, Quintana Roo, Jalisco y Nayarit y durante el 2010 en el Estado Campeche, Sinaloa y Colima (SENASICA 2010). Reportes oficiales internos a finales de 2013, indicaron una condición atípica relacionada con la detección recurrente de muestras vegetales asintomáticas en plantas de naranjo en la región norte del estado de Puebla. En México no se había reportado esta condición, por lo se establecen acciones de investigación para estudiar, analizar y explicar la condición epidémica del HLB en plantas asintomáticas. Por disposición oficial, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) solicitó al Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF) el confinamiento de dos árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) los cuales resultaron positivos a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y a partir de ellos realizar investigación técnico-científica para estudiar la condición asintomática en cítricos dulces a través de criterios epidemiológicos (CP-LANRF, 2005).

La principal forma de dispersión de HLB es a través dos insectos vectores: *Diaphorina citri* (Kuwayama) detectado en México en 2002 (López-Arroyo *et al.*, 2008) para *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Candidatus Liberibacter americanus* y por el insecto vector *Trioza erytreae* (Del Guercio) para *Candidatus Liberibacter africanus* (Auber, 1987, SENASICA, 2011).

La detección de la presencia de vector se localiza en tejidos tiernos o retoños de las plantas, en las principales plantaciones de cítricos y plantas hospedantes de la familia Rutácea, con énfasis en *Murraya paniculata* y *Swinglea glutinosa* (Limoncillo, en las hojas afectadas no se forman agallas ni verrugas, como en otros psílidos. (SAGARPA-SENASICA, 2009). Sin embargo, también cabe hacer mención, que la transmisión también se posibilita al momento de realizar podas de manejo y al injertar con material vegetal enfermo (Bové, 2006).

Las primeras manifestaciones de HLB en las hojas en naranjo dulce especialmente, son el síntoma del moteado manchado que es el síntoma para el diagnóstico de la enfermedad. Las hojas pueden ser pequeñas y estar erguidas con una variedad de patrones cloróticos que a menudo se parece a deficiencias minerales como las de zinc, hierro y manganeso (University of Florida,

2018). Frutos deformes y semillas atrofiadas, inversión de color (reverdecimiento), sistema vascular del fruto color amarillo, ramas amarillas (sectorización) y muerte de ramas (SAGARPA, 2009). En naranjo (Esquivel *et al.*, 2012) se reportó a nivel macroscópico desde punteado clorótico hasta amarillamiento y abscisión foliar, e histológicamente se observó el floema de la nervadura central en hojas con hiperplasia y aumento de proteínas.

La enfermedad ha provocado nivel global la pérdida de más de 60 millones de árboles (10 millones sólo en Brasil), provocando en países como Sudáfrica, hasta el 100 % de pérdidas de la cosecha, solamente en Florida Estados Unidos, el HLB ha ocasionado un incremento en los costos de producción de hasta el 50%. En México, durante el primer año que el HLB fue detectado causó una reducción en el rendimiento de los árboles afectados de hasta un 50%, estimándose que, en un plazo de cinco años, bajo un escenario de alto impacto de la enfermedad, las pérdidas potenciales de las zonas productoras serían de cerca de tres millones de toneladas, equivalentes al 41 % de la producción total (FAO, 2013). Por ejemplo en experiencias recabadas en plantaciones de limón Mexicano, en el Estado de Colima a ocho años de su aparición (2010), en plantaciones con buen manejo de riegos y fertilización, los árboles reducen su capacidad de fructificación hasta un 50%, pero si el manejo nutricional es deficiente las pérdidas de rendimiento pueden superar el 80% (Robles *et al.*, 2018).

Se ha estimado que el HLB está afectando el potencial de rendimiento de los árboles de limón mexicano y que la reducción del rendimiento está en función del porcentaje de la copa del árbol que presenta los síntomas de la enfermedad. Los árboles de huertos con buen manejo de riegos y fertilización cuando alcanzaron el 100% de su copa mostrando síntomas de la enfermedad, pueden reducir su potencial de rendimiento hasta un 50%. Los frutos cosechados de sectores con síntomas de la enfermedad tienen menor tamaño que los frutos cosechados de sectores aparentemente sanos (Robles *et al.*, 2013).

En áreas donde la infección no está presente, las medidas efectivas cuarentenarias son esenciales para prevenir la entrada del HLB o del vector. No hay control químico efectivo de la bacteria por lo que el principal manejo se enfoca en el control químico del vector, el control biológico es mediante avispas hiperparasíticas y uso de hongos entomopatógenos. Otro factor importante en el control es la vigilancia epidemiológica fitosanitaria como estrategia para detectar oportunamente brotes del vector (SENASICA, 2019). Como parte del control del patógeno en el 2009, la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, emitió la

NOM-EM-047-FITO-2009, y publicó el Acuerdo por el que se dan a conocer las medidas fitosanitarias que deberán aplicarse para el control del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter spp.*) y su vector.

La razón por la que la enfermedad de HLB es considerada como la más devastadora de los cítricos a nivel mundial, es debido a los daños que causa, dificultad de su diagnóstico, velocidad de dispersión, falta de variedades resistentes y falta de métodos eficientes de manejo de la bacteria.

### ***Citrus Tristeza Virus***

Otra enfermedad que afecta en gran medida a los cítricos es la denominada “tristeza” (Dawson *et al.*, 2015), causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV) (género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*) pues, se dice cambió el curso de la industria de los cítricos (Moreno *et al.*, 2008), y se clasificó como una de las enfermedades cítricas más importantes durante los últimos sesenta años (Bar-Joshep 1989). Los viriones polares de CTV están compuestos por dos proteínas de la cápside y un ARN genómico (ARNg) de cadena positiva y sentido simple de ~ 20 kb, que contiene 12 marcos de lectura abiertos (ORF) y dos regiones no traducidas (UTR). Los ORF 1a y 1b, que codifican proteínas del complejo replicasa, se traducen directamente del ARNg, y junto con los 5' y 3' UTR son las únicas regiones requeridas para la replicación de ARN. Los ORF restantes, expresados a través de ARN subgenómicos 3'-coterminales, codifican las proteínas necesarias para el ensamblaje y movimiento del virión (p6, p65, p61, p27 y p25), acumulación asimétrica de hebras positivas y negativas durante la replicación de ARN (p23), o la supresión de silenciamiento genético postranscripcional p25, p20 y p23 (Moreno *et al.*, 2008).

CTV se transmite verticalmente por propagación vegetativa de cítricos cuando se injerta un material propagativo infectado en un portainjerto y horizontalmente por varias especies de pulgones en un modo semipersistente (Dawson *et al.*, 2015). *Aphis gossypii* y algunos otros pulgones pueden transmitir algunos aislados de CTV, se cree que es el vector más eficiente es *Toxoptera citricida* (Dawson *et al.*, 2015). El virus se replica en las células del floema de algunas especies dentro de la familia Rutaceae y en el vector, el CTV y cítricos probablemente coevolucionaron durante siglos en el sitio de origen de las plantas de cítricos (Moreno *et al.*, 2008).

En 1983, se detectó por primera vez la presencia del virus tristeza de los cítricos en el Estado de Tamaulipas y en 1986 en Veracruz, ambos brotes fueron eliminados, en 1992 y 1993 detecciones de la plaga en el Estado de Veracruz también fueron destruidas por incineración. El

vector de la enfermedad, *Toxoptera citricida*, en el año 2000 fue detectado en huertos de traspatio en los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche y para evitar su diseminación y establecimiento en las zonas cítricas del territorio nacional se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-031- FITO-1995, “por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos” (SAGARPA, 2001).

Dawson y colaboradores (2015) plantearon dos factores que llevaron a la propagación de CTV, el primero fue el transporte de plantas vivas enfermas sin síntomas del virus, y el segundo factor fue la susceptibilidad de las variedades comerciales de cítricos que crecen en sus propias raíces a *Phytophthora* (podredumbre de la raíz), lo que provocó el uso naranjo agrio como portainjerto debido a que cumplía con ciertas características morfológicas y fisiológicas deseables en la producción de los cítricos, sin embargo éste es susceptible al deterioro y la muerte después de la infección por la mayoría de los aislamientos de CTV (Dawson *et al.*, 2015).

La dispersión de CTV a otras regiones y su interacción con nuevas variedades de vástagos y combinaciones de portainjerto dan como resultado tres síntomas distintos llamados tristeza o disminución, diferentes picaduras de tallo y amarillamiento de plántulas y retraso en el crecimiento (Moreno *et al.*, 2008, Dawson *et al.*, 2015).

En algunos países de América Central y del Sur como Belice, Chile, Ecuador, El Salvador, Honduras, México y Nicaragua. El CTV causa la enfermedad viral más dañina de los cítricos. En Argentina, durante su aparición en 1945, provocó la muerte de aproximadamente 10 millones de árboles y para 1959 esta cifra aumentó a 18 millones. En Brasil se reportaron más de 10 millones de árboles perdidos en 1958. En España, durante la década de los sesenta y en Venezuela en los años ochenta murieron 16 millones de árboles (Rocha-Peña *et al.* 1995).

Las medidas para controlar el daño de CTV incluyen: programas de certificación de cuarentena y de brotes, eliminación de árboles infectados, uso de portainjertos tolerantes a tristeza (Moreno *et al.*, 2008), el uso de portainjertos tolerantes de naranjo agria, sin embargo, esos portainjertos tenían características menos deseables, ya que eran menos productivos y a su vez, susceptibles a otras enfermedades (Dawson *et al.*, 2015), la protección cruzada con aislamientos leves, dependiendo de la incidencia de CTV y de las cepas de virus y variedades hospedantes predominantes en cada región (Moreno *et al.*, 2008).

En México el uso de naranjo agrio como portainjerto y su susceptibilidad a CTV, la distribución del vector, la presencia de cepas atenuadas, moderadas y severas, son algunos de los problemas que provocan pérdidas importantes.

### **Interacción Planta-Patógeno**

Los patógenos vegetales son responsables de importantes pérdidas en la producción de cultivos, sin embargo, las plantas son capaces de reaccionar para defenderse tanto de estrés biótico como abiótico utilizando una serie de mecanismos naturales de protección estructural, química y proteica diseñados no sólo para detectar la invasión de organismos sino también para detenerlos antes que causen daño más extensivo. La defensa de las plantas ante el ataque de organismos extraños se puede dar a través de mecanismos que incluyen el fortalecimiento de la pared celular, la producción de compuestos antimicrobianos y la generación de especies reactivas de oxígeno y cuando se superan todos estos mecanismos, entonces se considera que el patógeno es exitoso ya que superan estas defensas y obtienen nutrientes del huésped. Esta respuesta involucra la activación diferencial de genes y cambios metabólicos que regulan su respuesta ante una infección o estrés fisiológico (Madriz, 2002; Freeman y Beattie 2008; Martinelli *et al.*, 2015).

Existe un sistema de regulación genética para que el genoma completo de todas las células de todas las especies no se esté transfiriendo continuamente durante toda la vida. Se han desarrollado mecanismos muy refinados que regulan la transcripción, lo que optimiza la eficiencia genética (Klug *et al.*, 2006). Los genes de una célula no se expresan todos en todo momento, ya que los diferentes tipos de células en diferentes momentos tienen funciones y necesidades distintas. El hecho de qué genes son activados o desactivados y por cuánto tiempo permanecen activos, está bajo el control de otros segmentos de ADN llamados promotores o terminadores, que funcionan como señales para que los genes se expresen o dejen de expresarse, respectivamente; o bien sirven como señales para la síntesis de ARNt y proteínas que a su vez funcionan como inductores, promotores y estimulantes de la expresión genética o como represores y terminadores de ella. En muchos casos las interacciones que se establecen entre el hospedante y el patógeno, los genes de un componente son inducidos para que se expresen gracias a la acción de una sustancia producida por el otro componente (Agrios, 1998).

Un patógeno es un organismo o virus capaz de causar enfermedades, es decir; una desviación perjudicial de la función fisiológica normal o interrupción significativa en un huésped o rango de

huéspedes. Puede ser causada por agentes bióticos incluyendo hongos y bacterias o bien por factores ambientales abióticos tales como deficiencias nutrimentales, sequía, falta de oxígeno, temperaturas altas, radiaciones ultravioletas y contaminación (Collinge y Slusarenko 1987; Freeman y Beattie, 2008).

Los patógenos de las plantas se clasifican en función de su forma de alimentación, los patógenos biotróficos, requieren nutrientes de las células vivas y por lo tanto, deben mantener la vivo el huésped, contrario de los patógenos necrotróficos matan activamente el tejido del huésped a medida que colonizan y prosperan en el contenido de células muertas o moribundas, los hemibiotróficos, muestran ambas formas de adquisición de nutrientes, pasando de una fase biotrófica temprana a necrótrfica en las etapas posteriores de la enfermedad. La duración de la fase biotrófica o necrotrófica varía significativamente entre los patógenos hemibiotróficos. De hecho, las "asociaciones simbióticas" pueden pasar fácilmente de una a otra siguiendo pequeños cambios ecológicos (Van Baalen *et al.*, 2001; Laluk *et al.*, 2010).

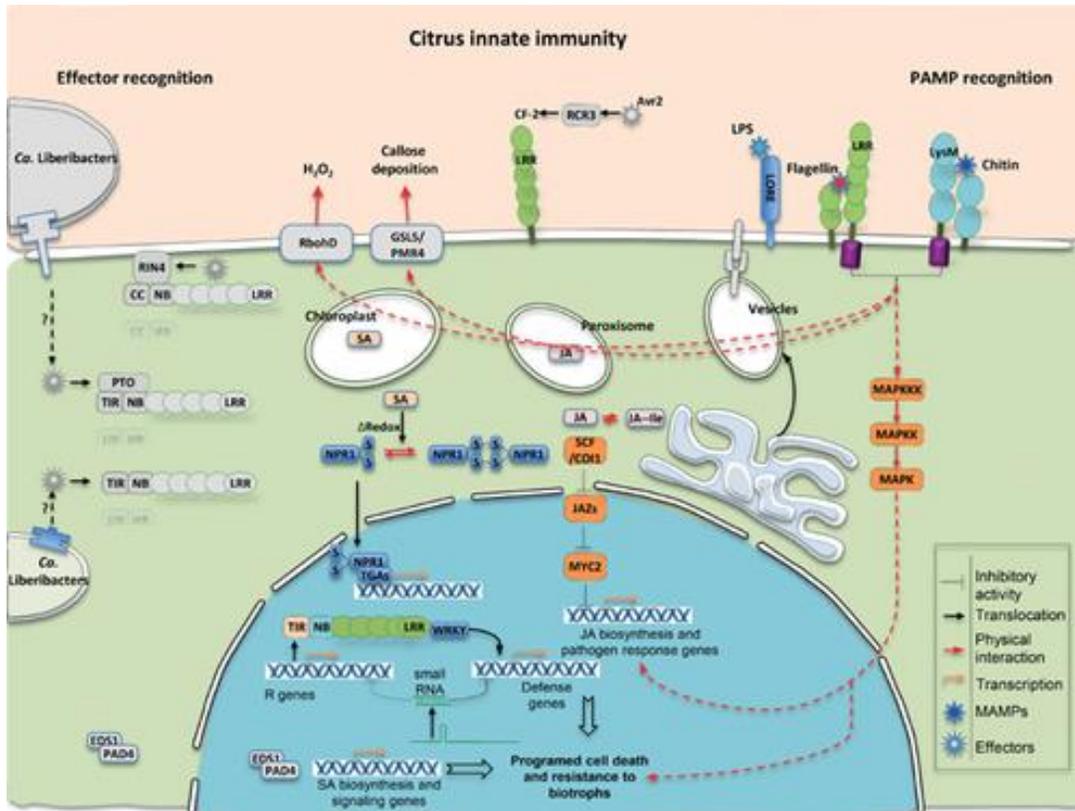
En este sentido, la resistencia es la capacidad del huésped para suprimir o retardar la actividad de un patógeno. La resistencia es una propiedad cuantitativa y se considera mejor en relación con la virulencia del patógeno. Virulencia describe dos conceptos; el grado de patogenicidad (es decir, la "agresividad" del patógeno), el término que se refiere a la gravedad de la enfermedad causada por el patógeno, la virulencia en relación con el rango del huésped. Cuando dos variantes fisiológicas de un patógeno causan diferentes reacciones en el mismo cultivar huésped, una que conduce a la enfermedad y la otra no, pueden clasificarse como diferentes razas del patógeno, lo que lleva al término resistencia específica de la raza. Se dice que una raza (que causa la enfermedad) es virulenta en el cultivar, mientras que las otras se describen como avirulentas (o no virulentas). Cuando un patógeno de una especie de planta huésped particular entra en contacto con una especie diferente en la que normalmente no causa enfermedad, el tipo de resistencia expresada se llama instancia de no hospedadora y se dice que el organismo no es patógeno al anfitrión. Por lo tanto, cuando se usa de esta manera, el término no patógeno es sinónimo del tema virulento para las interacciones raza-cultivar (Collinge y Slusarenko 1987; Agrios, 1998; Barrett *et al.*, 2009).

La resistencia de las plantas a las enfermedades frecuentemente resulta de la interacción específica de genes de resistencia (*R*) de las plantas con los correspondientes genes de avirulencia (*Avr*) de los patógenos. Algunos de los procesos bioquímicos y fisiológicos asociados con la

resistencia gen por gen son la generación de especies reactivas de oxígeno, la producción de óxido nítrico, la producción de compuestos antimicrobianos, la peroxidación de lípidos, el flujo de iones, y la inducción de genes de defensa, entre otros. El disponer de los genes R clonados abre nuevas posibilidades de incorporar por transformación genética, genes de resistencia nuevos a las plantas (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 2004.)

Se han descrito varios modelos conceptuales y varias revisiones del sistema inmune vegetal todos ellos basándose en que la respuesta de una planta ante un patógeno, el cual depende de su sistema innato de inmunidad principalmente controlado por receptores codificados que identifican una invasión. Muchos de estos modelos tratan de explicar sistemas complejos de respuesta de las plantas y lejos de aclarar dudas científicas generan cada vez nuevas hipótesis (Bent y Mackey 2007; Freeman y Beattie 2008; Vlot *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2015; da Graça *et al.*, 2015).

El sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que actúa de dos formas fundamentales: la primera está basada en un reconocimiento de PAMP mediante receptores que reconocen estos patrones (PRRs) y que se encuentran en la superficie de las células vegetales, y se denomina PTI (PAMP-triggered immunity). En la Figura 1, se visualiza la posible respuesta cuando hay un reconocimiento exitoso del patógeno en cítricos, este produce efectores que inhiben la PTI, los cuales son reconocidos por las plantas mediante receptores adicionales, proteínas NB-LRR (nucleotidebinding leucine-rich repeat), los cuales desencadenan respuestas efectoras contra estos que constituyen la segunda forma de actuación de la inmunidad innata y se denomina ETI (effector-triggered immunity) (Jones y Dangl, 2006). Si un efector es reconocido por la proteína NB-LRR correspondiente, se activa ETI, que es más rápida y fuerte que PTI y a menudo culmina en una reacción de hipersensibilidad (RH). La RH no se extiende normalmente más allá de la célula infectada: puede retardar el crecimiento del patógeno en algunas interacciones, particularmente las que involucran patógenos formadores de haustorios, pero no siempre se puede observar, ni se requieren para ETI (Jones y Dangl, 2006).



**Figura 1.** Modelo conceptual de inmunidad innata de los cítricos. Los componentes de inmunidad de los cítricos identificados hasta la fecha (y sus vías de señalización, catalíticas y metabólicas asociadas). Los homólogos de cítricos informados de los componentes de la inmunidad innata (y las vías relacionadas) están coloreados, mientras que los componentes aún no identificados o las funciones poco claras se muestran en gris. Las líneas continuas indican interacciones, translocaciones o biosíntesis confirmadas, mientras que las actividades no confirmadas se indican con líneas discontinuas. Tomado de da Graça *et al.* (2015) adaptada de Panstruga *et al.* (2009).

Generalmente se considera que los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) se conservan en todas las clases de microbios y contribuyen a la aptitud microbiana general mientras que los efectores son específicos de especie, raza o cepa y contribuyen a la virulencia de los patógenos. Ambos tipos de moléculas pueden desencadenar la inmunidad de la planta denominada inmunidad activada por PAMP y desencadenada por efectores (PTI y ETI, respectivamente). Sin embargo, no todos los activadores de defensa microbiana se ajustan a la distinción común entre PAMP y efectores (Thomma *et al.*, 2011). Dangl y Jones (2001), propusieron que las proteínas R de las plantas podrían ser activadas indirectamente por efectores codificados por patógenos y no por su reconocimiento directo.

Freeman y Beattie (2008) explican que las plantas han desarrollado defensas constitutivas e inducibles para defenderse de daños. Las defensas constitutivas incluyen barreras preexistentes en las plantas como paredes celulares, cutículas serosas y cortezas que confieren fuerza y rigidez mientras que las defensas inducibles se producen sólo en respuesta a una invasión o ataque e incluye la producción de químicos tóxicos, la producción de enzimas que degradan patógenos e incluso suicidio celular deliberado (RH).

Flor (1971) propuso que los genes de las plantas y de los patógenos interactuaban particularmente para proveer resistencia a enfermedades. Su hipótesis de gen por gen planteaba que un solo gen dominante de resistencia (*R*) en la planta interactuaba en respuesta a un patógeno que expresaba un gene dominante de avirulencia (*Avr*), es decir, que se daba un reconocimiento entre la planta y el patógeno. Propuso esto en base a los estudios de heredabilidad del hongo *Melampsora lini* en lino (*Linum usitatissimum*) y afirma en su revisión que esta hipótesis es aplicable a la mayoría de sistemas huésped-parásito en los que la resistencia está condicionada por genes principales (resistencia vertical) y en los que la virulencia incrementa paso a paso.

La relación entre las plantas y sus microbios está determinada por el sistema de inmunidad innato de la planta. Este sistema reconoce como “no propios” los patrones moleculares asociados al microbio MAMP (Microbe-associated molecular patterns) o bien PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) si es un patógeno. Este “no reconocimiento” está mediado por los PRRs (host-pattern recognition receptors) localizados en la superficie de la membrana celular del huésped. En el caso de ser un patógeno, el reconocimiento de PAMP activa los PTI (PAMP-triggered immunity) que se manifiesta en una cascada de proteínas quinasas de señalización activada por mitógenos (en inglés mitogen-activated protein MAP kinase signaling), inducción transcripcional de genes de respuesta a patógenos, producción de especies reactivas a oxígeno y en deposición de calosa para reforzar la pared celular en los sitios de la infección, todo lo anterior contribuye a prevenir la expansión de la infección (da Graça *et al.*, 2016).

### **Usos de análisis genómicos**

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar ataques de insectos, patógenos o estrés ambiental que involucran la modificación de la expresión génica, la activación de varias rutas metabólicas y la modificación post-traduccional de proteínas, que culminan en la acumulación de metabolitos primarios y secundarios implicados en las respuestas de defensa de

las plantas. El reciente avance en las técnicas ómicas permite aumentar el entendimiento de los transcriptomas, proteomas y metabolomas de las plantas durante el ataque de patógenos y la modulación de la respuesta después de la infección. Las técnicas ómicas también permiten entender a detalle el ciclo biológico de los patógenos, además de la identificación de nuevos factores de virulencia en los patógenos. Por lo que constituyen importantes herramientas de investigación en el desarrollo de nuevas tecnologías para la protección contra enfermedades y mejorar la producción vegetal (Gomez-Casati *et al.*, 2016). Muchos de los genes inducidos en reacción a estos estímulos, codifican proteínas con un papel defensivo, incluidas las enzimas para la biosíntesis de fitoalexinas, glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas quitinasa relacionadas con la patogénesis, glucanasas e inhibidores de proteasas (Bradshaw *et al.*, 1987). Los estudios del transcriptoma se pueden aplicar para estudiar los genes con variaciones en número de partes, órganos, tejidos o células incluidos en el organismo y diversos objetivos, desde la determinación de las funciones genéticas, las interacciones entre los genes en el desarrollo, los ciclos de vida de los organismos, entre otros (Klepikova y Penin, 2019). El conocimiento del transcriptoma y su regulación es fundamental para la interpretación articulada de los diversos constituyentes moleculares que integran la red de respuesta génica ante un determinado evento inductor, como los que se presentan en interacciones planta-patógeno, la transcriptómica como herramienta permite el secuenciamiento masivo de ADNc o ARN y hace posible obtener perfiles de expresión génica de las respuestas de defensa, lo cual ofrece grandes posibilidades para profundizar en el entendimiento de los mecanismos que se activan durante las respuestas inmunes en plantas (Soto *et al.*, 2012).

En cítricos la transcriptómica se ha usado para comparar la respuesta del huésped a CLas en frutas, hojas, sintomáticas, asintomáticas y no infectadas entre genotipos tolerantes y susceptibles a HLB (Martinelli *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2013; da Graça *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Estos estudios han evidenciado los daños fisiológicos dentro del huésped causados por la infección y la activación de los mecanismos de defensa que pudieran estar asociados con la tolerancia y permiten desarrollar estrategias para su control, detección y mejoramiento genético (Fu *et al.*, 2016).

Un buen entendimiento de los mecanismos básicos que controlan las interacciones entre plantas-patógeno, por medio de estudios de ARN, pueden permitir el empleo de métodos biotecnológicos para desarrollar programas de mejoramiento genético enfocados a implementar resistencia en plantas.

## **Técnicas de análisis genómicos**

Las técnicas de análisis genómico que se basan en la secuenciación masiva han supuesto una revolución en la última década no sólo en biomedicina o agronomía, sino también en el estudio de la diversidad biológica (López de Heredia, 2016). Actualmente las tecnologías de análisis de ARN como RT-qPCR, microarrays, RNA-seq entre otras proveen los medios para investigar y entender a nivel del transcriptoma, la respuesta que las plantas accionan para defenderse (Yu *et al.*, 2017).

Los microarrays consisten en superficies sólidas con celdillas en las que se depositan una serie de secuencias de nucleótidos de manera ordenada y que se basan en la capacidad de hibridación entre dos cadenas de ADN complementarias entre sí, permiten evaluar la expresión diferencial de miles de genes simultáneamente, presentan algunas complicaciones en su diseño derivadas de la necesidad de conocer a priori las secuencias de interés de los organismos de estudio, algo que en muchos casos no es posible cuando se trabaja con especies no modelo. Así, la siguiente revolución en el estudio de los seres vivos y de las interacciones entre éstos, es decir las plataformas de secuenciación de alto rendimiento (Next Generation Sequencing - NGS-) (López de Heredia, 2016).

El RNA-seq es una herramienta transcriptómica actual que está fundamentada en la secuenciación de ADNc basada en NGS. En esta tecnología se captura el ARN total o ARNm, el cual se fragmenta y convierte en una librería de ADNc. Generalmente el fraccionamiento se realiza posteriormente a la síntesis de ADNc. Una vez obtenido el ADNc se ligan adaptadores de tal forma, que cada fragmento generado contendrá un adaptador ligado en sus extremos 3' y 5', sin embargo, no en todos los casos se requiere la ligación de adaptadores, lo cual dependerá de la plataforma de secuenciación a emplear. Existen diferentes plataformas y estrategias de secuenciación, de las que el investigador tiene la posibilidad de elegir, actualmente está disponible comercialmente en las compañías Roche/454, Solexa/ Illumina, SOLiD/Life Technologies y Helicos/ BioSciences (Soto *et al.*, 2012; Kukurba y Montgomery, 2016).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en su versión cuantitativa, acoplada a la transcriptasa reversa (RT-qPCR) es utilizada frecuentemente en la investigación científica (Cuevas-Reyes *et al.*, 2016). La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-qPCR) permite realizar estudios de los niveles de expresión génica presentes en la planta, es el método más sensible para la detección de ARNm en bajas cantidades (Bustin, 2000; Cuevas-Reyes *et al.*, 2016). El ARNm usualmente es de una sola hebra y fácilmente degradable, imposibilitando

realizar una PCR a esta molécula haciendo necesario la síntesis de una cadena de ADN complementaria a partir de ARN por medio de la transcriptasa reversa. Se pueden utilizar cebadores específicos al gen de interés, hexámeros de secuencia al azar u oligo dT. El ARNm es copiado a ADNc por la enzima transcriptasa reversa la cual actúa a 42-44 °C usando un primer dT, la transcriptasa reversa elimina el ARNm permitiendo que una segunda hebra de ADN sea formada (Sambrook *et al.*, 1989). La técnica de RT-qPCR permite cuantificar los niveles de expresión genética; sin embargo, es importante evaluar la eficiencia y el rango dinámico del primer a utilizar, con los reactivos y equipo con que se pretende evaluar los niveles de expresión genética, independientemente de los reportes previos sobre el desempeño de tales primer, para descartar la posibilidad de que las diferencias observadas estén influenciadas por aspectos técnicos y no sólo por causas biológicas (Cuevas-Reyes *et al.*, 2016). La amplia cantidad de aplicaciones de la PCR en tiempo real, abre nuevas oportunidades de investigación asociadas con una comprensión integral de la ecología y la dinámica de población de los patógenos con la intención final de optimizar el manejo de enfermedades de las plantas (Mirmajlessi *et al.*, 2015). A medida que aumenta el conocimiento sobre los genomas de los microorganismos individuales, aumenta el uso de esta técnica para una amplia gama de microorganismos.

## LITERATURA CITADA

- Agrios NG, 1998. Fitopatología. Agrios 2ª edición México: Limusa 1998, p 119-121.
- Agustí M. 2003. Citricultura. 2ª edición. Ediciones Mundi-prensa. España. 336-337 p.
- Amoros M. 2003. Producción de Agrios. 3ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 45, 139-140 p.
- Attaran E, Berim A, Killiny N, Beyenal H, Gang DR and Omsland A. 2020 Controlled replication of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' DNA in citrus leaf discs. *Microbial Biotechnology* 0(0), 1–13. doi:10.1111/1751-7915.13531
- Aubert B. 1987. *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: *Psylloidea*), the two vector of Citrus Greening Disease: Biological aspect and possible control strategies. *Fruits* 42(3):149-162.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. 2003. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Volume publication date September 1989. *Annual Review of Phytopathology* 27: 291-316. DOI: 10.1146/annurev.py.27.090189.00145

- Barrett LG, Kniskern JM, Bodenhausen Natacha, Zhang W Joy Bergelson. 2009. Continua of specificity and virulence in plant host–pathogen interactions: causes and consequences. *New Phytologist* 183: 513–529 doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02927.x
- Bent AF and Mackey D. 2007. Elicitors, effectors and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* 45:399-436. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427
- Boava PL, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2017. Physiologic, anatomic, and gene expression changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata*, and their hybrids after ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. *The American Phytopathological Society* 107(5):590-599. doi: 10.1094/PHYTO-02-16-0077-R
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive emerging, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant pathology* 88(1):7-37. DOI: 10.4454/jpp.v88i1.828
- Bradshaw HD, Hollick JB, Parson TJ, Clake HRG and Gordon MP. 1989. Systemically wound-responsive genes in poplar trees encode proteins similar to sweet potato sporamins and legume Kunitz trypsin inhibitors. *Plant Molecular Biology* 14:51-59. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00015654.pdf>
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193. <https://www.gene-quantification.de/bustin-2000.pdf>
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193. <https://www.gene-quantification.de/bustin-2000.pdf>
- Collinge BD and Slusarenko A. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology* 9:389-410. DOI: 10.1007/BF00014913
- Cook DE, Mesarich CH and Thomma BPHJ. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology* 53:541-563. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120114
- Cuevas-Reyes E, Carrillo-Morales M, Treviño-Quintanilla LG, Aparicio-Frabre R y Hernández-Romano J. 2016. Evaluación de oligonucleótidos para medir expresión genética durante la marchitez bacteriana del tomate. *Revista fitotecnia mexicana* 39(2): 141-150. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018773802016000200141&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802016000200141&lng=es)
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert S, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G and Zhao H. 2016. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 58:373-387. Doi:10.11/jipb.12437

- Dangl JL and Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Dawson WO, Bar-Joseph M, Garnsey S, Moreno P. 2015. *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology* 53: 137-155. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120012
- Díaz-Padilla G, López-Arroyo J, Sánchez-Cohen I, Guajardo-Panes R, Mora-Aguilera G y Quijano-Carranza J. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7):1137-1153. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200709342014000700001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342014000700001&lng=es&tlng=es).
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez J L y López-Arroyo JI- 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46 (8):769-782. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952012000800003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000800003&lng=es&nrm=iso)
- FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. 2013. ‘Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe’. <http://www.fao.org/3/a-i3319s.pdf>
- Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo J, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 195-210. [www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092015000200195&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092015000200195&lng=es&tlng=es).
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey S M, Gowda and Dawson WO. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354. Doi: 10.1094/PHYTO-99-12-1346
- Folimonova SY. 2020. *Citrus tristeza virus*: A large RNA virus with complex biology turned into a valuable tool for crop protection. *PLoS Pathogens* 16(4): e1008416. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008416>
- Freeman BC and Beattie GA. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/phi-i-2008-0226-01.
- Gomez-Casati DF, Pagani MA, Busi MV and Bhadauria V. 2016. Omics Approaches for the Engineering of Pathogen Resistant Plants. *Current Issues Molecular Biology* 19:89-98.

- García Pineda E y Lozoya-Gloria E. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 22(3):414-422. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222315>
- Halbert S and Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87(3):330-353. DOI: 10.1653/0015-4040(2004)087[0330: ACPSPA] 2.0.CO; 2
- Hui-Ling L and Burns JK. 2011. Gene expression in *Citrus sinensis* fruit tissues harvested from Huanglongbing-infected trees: Comparison with girdled fruit. Journal of Experimental Botany 63(8):3307-19 DOI: 10.1093/jxb/ers070
- Killiny N, Hijaz F, Ebert TA and Rogers ME. 2017. A Plant Bacterial Pathogen Manipulates Its Insect Vector's Energy Metabolism. Applied and Environmental Microbiology 83(5):1-15pp. DOI: 10.1128/AEM.00910-17
- Klepikova A and Penin AA. 2019. Gene expression maps in plants: current state and prospects. Plants 8(309):18. <https://doi.org/10.3390/plants8090309>
- Klug WS. 2006. Conceptos de genética. 8a Ed. Pearson Educación. ISBN 8420550140, 9788420550145. 920p
- Kukurba KR and Montgomery SB. 2015. RNA Sequencing and Analysis. Cold Spring Harbor Protocols (11): 951–969. doi:10.1101/pdb.top084970
- Laluk K and Mengiste T. 2010. Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? The Arabidopsis Book, 8, e0136. <https://doi.org/10.1199/tab.0136>
- López de Heredia U. 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. Munibe Ciencias Naturales 64:25. DOI: 10.21630/mcn.2016.64.07
- López-Arroyo JI, Jasso J, Reyes MA, Loera-Gallardo J, Cortes-Mondaca E and Miranda M. 2008. Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in México. International Research Conference on Huanglongbing, Orlando, Florida. 289 p.
- López-Arroyo JI, Peña MA, Rocha-Peña MA y Loera J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), pp. C68. In: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., México.
- Madriz KO. 2002. Mecanismos de defense en las interacciones planta-patógeno. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) 63:22-23. <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6562/A2097e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 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>

- Martinelli F, Ibanez AM, Reagan RL, Davino S and Dandekar AM. 2015. Stress responses in citrus peel: Comparative analysis of host responses to Huanglongbing and puffing disorder. *Scientia Horticulturae* 192:409-420. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.06.037.
- Mirmajlessi SM, Loit E, Mänd M, Mansouripour S. 2015. Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis - a Review. *Plant Protection Science* 51:177-190. Doi: 10.17221/104/2014-PPS.
- Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J and Peña L. 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9(2):251-264. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00455.
- Nehela Y and Killiny N. 2018. Infection with phytopathogenic bacterium inhibits melatonin biosynthesis, decreases longevity of its vector, and suppresses the free radical-defense. *Journal of Pineal Research* 65(3): 1-15. DOI: 10.1111/jpi.12511
- Pagliai FA, Pan L, Silva D, González CF and Lorca GL. 2018. Zinc is an inhibitor of the LdtR transcriptional activator. *PLoS ONE* 13(4):1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0195746
- Pitino MCh, Armstrong M and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrus plants in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *Horticulture Research* 17040(4):1-8. DOI: 10.1038/hortres.2017.40
- Ramadugu Ch, Keremane ML, Halbert SE, Ping YD, Roose ML, Stover E and Le RF. 2016. Long term field evaluation reveals HLB resistance in Citrus relative. *Plant Disease* 100(9):1-64. doi: 10.1094/PDIS-03-16-0271-RE
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla MA, Ramírez M, Orozco-Santos V y Medina-Urrutia M. 2013. Experiencias sobre el Huanglongbing (HLB) en limón mexicano en Colima. *In: Simposio Internacional sobre cítricos ácidos. Memoria científica/ISBN: 978-607-37-0224-9. 7:35.*
- Robles GMM, Orozco SM, Manzanilla RMA, Velázquez MJJ, Mediana UVM y Sanches SE. 2018. Experiencias con Huanglongbing en limón mexicano en el Estado de Colima México. *Citrus Reseach & Technology* 39:12. Doi: org/10.4322/crt16518.
- Rocha-Peña MA. 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79:437-445.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013, Buscan promover la investigación del HLB. Nota de Prensa. Monterrey Nuevo León. Publicado y disponible en línea en: [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx).
- Sambrook J, Fritsch FE and Maniatis. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition. New York, USA. 1626 p. ISBN-10: 0879693096 1626 p.

- SENASICA, 2001. NORMA Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, Por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. DOF 10 de agosto de 2001. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=695>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2009. AVISO de Prórroga de la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009, Por la que se establecen las acciones fitosanitarias para mitigar el riesgo de introducción y dispersión del Huanglongbing (HLB) de los cítricos (*Candidatus Liberibacter spp.*) en el territorio nacional. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=19617>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2010. ACUERDO por el que se dan a conocer las medidas fitosanitarias que deberán aplicarse para el control del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter spp.*) y su vector. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx). <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=19617>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2011. Ficha técnica HLB Huanglongbing. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal - Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Con la colaboración del Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LaNREF) Cd. de México. Ficha técnica 31p. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/ficha-tecnica-plagas-reglamentadas-de-los-citricos>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2019. Ficha técnica Huanglongbing ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal - Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Con la colaboración del Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LaNREF) Cd. de México. Ficha técnica 78 Última actualización: abril, 2019. 34p. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/ficha-tecnica-plagas-reglamentadas-de-los-citricos>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2019. Psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Fecha de la última actualización: mayo de 2019. Ficha Técnica 77. 16 pp. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/ficha-tecnica-plagas-reglamentadas-de-los-citricos>
- SENASICA-SIRVEF, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Sistema Integral de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria 2020. Vigilancia del Huanglongbing Publicado y disponible en línea en: <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/HLBV2.aspx>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Panorama agroalimentario 2019. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/)

- Soto SJC y López CCE. 2012. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad* 16(2):101-113. ISSN: 1562-3009. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2091/209126216009>
- The American Phytopathological Society, 2015. Oral Technical Session: Liberibacter-Session 1. APS Annual Meeting, August 1-5, Pasadena, California, U.S.A. [http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015\\_meeting\\_abstracts](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts)
- University of Florida. 2018. Symptoms. Institute of Food and Agricultural Sciences, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, FL 33850, USA. <https://crec.ifas.ufl.edu/hlb-information/greening/symptoms/>
- Van Baalen M and Jansen VAA. 2001. Dangerous liaisons: the ecology of private interests and common good *Oikos* 95:211-24. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2001.950203.x
- Vlot AC, Dempsey DA and Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47:177-206. DOI: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202
- Yu Q, Chen Ch, Du D, Huang M, Yao J, Tu F, Brlansky RH and Gmitter Jr FG. 2017. Reprogramming of a defense signaling pathway in rough lemon and sweet orange is a critical element of the early response ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’. *Horticulture Research* 4, 17063. doi:10.1038/hortres.2017.63
- Zheng Z, Chen JJ and Deng X. 2018. Historical perspectives, management, and current research of Citrus HLB in Guangdong Province of China, Where the disease has been endemic for over a hundred years. *Phytopathology* 108(11):1224-1236. doi: 10.1094/PHYTO-07-18-0255-IA.



# CAPÍTULO I. VALIDACIÓN DE RT-qPCR PARA ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN *Citrus sinensis* CON CLAs O CTV

## 1.1 RESUMEN

La RT-qPCR es una técnica sensible, precisa y ampliamente utilizada para estudios del perfil de expresión de genes. El método consiste en la síntesis de ADN complementario a partir de ARN, mediante retrotranscripción y la amplificación específica por PCR en tiempo real, empleando el fluoróforo de doble cadena. La estandarización de la técnica incluye: la elección y utilización de genes de referencia adecuados para el estudio, la validación de qPCR y el diseño de las placas de qPCR, que en conjunto son indispensables para obtener una cuantificación correcta. En el presente trabajo se validó un protocolo de RT-qPCR óptimo para estudiar la respuesta diferencial de genes en naranjo dulce infectado con CLAs o CTV. La extracción de ARN se realizó a partir de 0.1 g de nervaduras centrales de *Citrus sinensis*. El método CTAB 2% permitió un rendimiento de 200-1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ARN total con relación A260/280, A260/230 entre 1.8-2. Se homologó la concentración de ARN a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para la síntesis de ADNc en dos pasos empleando un protocolo no comercial. Para la qPCR se optimizó el volumen de reacción a 10  $\mu\text{L}$ , con 1X de SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1  $\mu\text{L}$  de ADNc [50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ]. Las curvas de disociación reflejaron la optimización de la qPCR. La configuración del experimento consistió en tres réplicas técnicas por cada réplica biológica de cada tratamiento. Con el rango dinámico de  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^0$  de ADNc total se parametrizó una pendiente negativa (Slope) = -3.332 y -3.48, una  $R^2$  de 0.980 y 0.998 y una eficiencia de reacción (E) de 91 y 106% para el gen de Actin y *CDR13*, respectivamente. Los genes *GAPDH* y Actin (Act3) son los mejores candidatos para emplearse como genes de referencia para el estudio de expresión génica en cítricos infectados por CLAs o CTV al mostrar reproducibilidad y estabilidad en todas las muestras empleadas en este ensayo.

**Palabras clave adicionales:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus tristeza virus*, optimización, cuantificación, *GAPDH*

## Validation of RT-qPCR For Gene Expression Study in *Citrus sinensis* With CLAs or CTV

### 1.2 ABSTRACT

RT-qPCR is a sensitive, accurate, and widely used technique for studies of gene expression profiling. The method consists of the synthesis of complementary ADN from ARN, by means of retrotranscription and the specific amplification by real-time PCR, using the double-stranded fluorophore. The standardization of the technique includes the choice and use of suitable reference genes for the study, the validation of qPCR, and the design of the qPCR plates, which together are essential to obtain a correct quantification. In the present work, an optimal RT-qPCR protocol was validated to study the differential response of genes in sweet orange infected with CLAs or CTV. ARN extraction was performed from 0.1 g of *Citrus sinensis* midribs. The CTAB 2% method yielded 200-1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of total ARN with A260 / 280, A260 / 230 ratio between 1.8-2. The RNA concentration at 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  was homologated for two-step cDNA synthesis using a non-commercial protocol. For qPCR, the reaction volume was optimized to 10  $\mu\text{L}$ , with 1X SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1  $\mu\text{L}$  cDNA (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Dissociation curves reflected the optimization of qPCR. The experiment setup consisted of three technical replicates for each biological replica of each treatment. With the dynamic range of  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^0$  of total cDNA, slope = -3.332 and -3.48, and R<sup>2</sup> of 0.980 and 0.998 and a reaction efficiency (E) of 91% and 106% were parameterized for the Actin gene and *CDR13*, respectively. The GAPDH and Actin (Act3) genes are the best candidates for reference genes for the study of gene expression in citrus infected by CLAs or CTV, since they show reproducibility and stability in all the samples used in this assay.

**Additional keywords:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus tristeza virus*, optimization, quantification, *GAPDH*,

### 1.3 INTRODUCCIÓN

En 2018, México se ubicó como el cuarto productor de naranja a nivel mundial con un volumen promedio de 4.7 millones de toneladas, las cuales se comercializaron tanto en el mercado interno como en destinos internacionales (SIAP, 2019). Los cítricos están amenazados por enfermedades como del Huanglongbing (HLB) cuyo agente causal es *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), una bacteria restringida a las células del floema, transmitida por *Diaphorina citri* y material vegetal infectado, causando clorosis asimétrica en el follaje, aborto de semillas, maduración inversa de los frutos y disminución en el rendimiento (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Flores-Sánchez *et al.*, 2015). Sin embargo, estos síntomas se pueden confundir con déficit de zinc, hierro, calcio, magnesio y manganeso (Robles-González *et al.*, 2013). Actualmente no existen variedades tolerantes, ni resistentes para control de esta enfermedad. El control se ha basado en la reducción de las poblaciones de *D. citri*, la detección oportuna de síntomas, así como nutrición, con la finalidad para amortiguar las alteraciones fisiológicas causadas por la bacteria (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Otra enfermedad importante en México es la ‘Tristeza de los cítricos’ (Rivas *et al.*, 2010), la cual es causada por el *Citrus tristeza virus* (*Closterovirus*) y se transmite por propagación vegetativa y varias especies de pulgones en un modo semipersistente. *Aphis gossypii* y otros pulgones pueden transmitir algunos aislados de CTV, pero el vector más eficiente es aparentemente *Toxoptera citricida* (Loeza *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2015). El virus se replica en las células del floema de algunas especies dentro de la familia Rutaceae (Moreno *et al.*, 2008). Los síntomas generales son disminución del vigor (tristeza), picaduras de tallo, amarillamiento de plántulas y retraso en el crecimiento (Rivas *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2015). Las medidas para controlar el daño de CTV han incluido programas de certificación, eliminación de árboles infectados, uso de portainjerto distinto a naranjo agrio, protección cruzada con aislamientos moderados (Moreno *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2015). Como alternativa para el control de CLAs y CTV, existen estudios de construcciones para transformación genética, enfocados en obtener plantas transgénicas resistentes a los patógenos (Loeza Kuk *et al.*, 2011; Ventura-Medina *et al.*, 2019).

El estudio del ARN mensajero mediante RT-PCR permite estudiar la expresión génica, cuantificando niveles altos o bajos de ARNm (Bustin, 2000). El ARNm usualmente es de una sola hebra y fácilmente degradable, imposibilitando realizar una PCR a esta molécula haciendo

necesario la síntesis de una cadena de ADN complementaria a partir de ARN por medio de la transcriptasa reversa. Se pueden utilizar cebadores específicos al gen de interés, hexámeros de secuencia al azar u oligo dT. El ARNm es copiado a ADNc por la enzima transcriptasa reversa la cual actúa a 42-44°C usando un primer dT, la transcriptasa reversa elimina el ARNm generando una segunda hebra de ADN sea formada (Sambrook *et al.*, 1989).

Los experimentos de perfil de expresión génica a menudo implican cuantificación relativa de ARNm expresado en dos o más condiciones experimentales (Bustin, 2000; Schroeder *et al.*, 2006). Un método para cuantificar este efecto es el monitoreo de la emisión de fluorescencia en la fase exponencial de la qPCR mediante el marcaje de las moléculas de doble cadena con SYBR® Green durante la qPCR (Bustin, 2000; Kaczmarczyk *et al.*, 2012). Existen dos variantes para la cuantificación empleando qPCR. La cuantificación absoluta se basa en la elaboración de una curva de calibración construida mediante la determinación del ciclo umbral en diluciones (rango dinámico) donde el número de copias del ADN target es conocido, mientras que cuantificación relativa se basa en la relación entre los niveles de expresión de un gen de interés (GOI o Gene of Interest) con respecto a los niveles de expresión de un gen de referencia (Ref) que se expresa constitutivamente, ésta última estrategia de cuantificación es conveniente para investigar los cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica (Pfaffl *et al.*, 2002). En relación al análisis de los datos, Bustin *et al.*, (2005) mencionan que es esencial aplicar una estrategia de normalización para controlar: la cantidad de material inicial y las diferencias entre las muestras.

Los objetivos en esta investigación fueron: estandarizar la técnica de RT-qPCR con protocolos no comerciales y evaluación de GAPDH, F-Box, Actin, 18S ARNr y Cox como genes de referencia, que permita estudiar la respuesta diferencial de genes en material infectado de CLas y CTV en hojas de *Citrus sinensis*.

## 1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El material vegetal se colectó en mayo del 2019 de la colección in vivo (2014) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecomán (INIFAP-C.E. Tecomán). Se seleccionaron tres plantas de *C. sinensis*/ *C. aurantium* positivas a CLas y CTV con inóculo procedente de Jalisco y Puebla, respectivamente. La muestra consistió en ocho hojas maduras por planta en diferente orientación y estrato. También se emplearon tres

plantas sanas de *C. sinensis*/ *C. aurantium* de 18 meses de edad, cuya condición fitosanitaria se confirmó por qPCR, resultando negativas a CLas y CTV.

### Extracción de ARN

Se empleó 0.1 g de nervadura central de hojas de naranjo, mediante el protocolo de CTAB 2%. Se cuantificó el rendimiento y calidad de ARN total obtenido empleando NanoDrop 2000, donde se verificó que las lecturas de absorbancia 260/280 nm y A260/280 se mantuvieran en un rango de 1.8-2.0, confirmando la ausencia de contaminación de proteínas o fenoles.

### Retrotranscripción

Previo a la síntesis de ADNc se homogenizó la concentración de ARN a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  empleando agua libre de nucleasas. La retrotranscripción se realizó en dos pasos mediante un protocolo no comercial, utilizando oligos dT. Se realizaron cinco ensayos (Cuadro 1.1 y 1.2) con el fin de mejorar la concentración de ADNc obtenido. La primera mezcla de reacción se incubó a 85 °C por 3 minutos en un termociclador BIO-RAD T100™ Thermal Cycler. Transcurrido este tiempo las muestras fueron colocadas en hielo durante 5 min.

**Cuadro 1.1.** Reactivos y volumen por ensayo para el primer paso de retrotranscripción (RT), mix de reacción (1X) en  $\mu\text{L}$ .

Reactivos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
ARN (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	3.0	3.0	3.5	3.0	3.0
<sup>2</sup> Oligo (dT) <sub>15</sub>	0.25	0.3	0.5	0.5	0.5
Primer (50mM)					
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	10.5	9.2	13.25	14.35	8.75
Volumen	13.75	12.5	17.25	16.85	12.25

<sup>2</sup>Promega

**Cuadro 1.2.** Mezcla de reacción empleada para el segundo paso de la retrotranscripción (RT) en  $\mu\text{L}$ .

Reactivos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
<sup>z</sup> Buffer-RT (5X)	4.0	4.0	4.5	4.2	4.5
<sup>z</sup> dNTP Mix (10 mM)	1.0	1.2	1.5	1.2	1.5
<sup>z</sup> M-MLV (2000 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	2.0	1.	1.5	1.5
<sup>z</sup> ARNsin (40 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25	0.3	0.25	0.25	0.25

Volumen final	20	20	25	25	20
<sup>z</sup> Promega					

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

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real; genes de referencia**

Se probaron cinco genes constitutivos (housekeeping), altamente conservados en organismos eucariotas y que han sido reportados tienen una expresión constante e independiente de la condición fitosanitaria (Cuadro 1.3). Se evaluó su comportamiento para normalizar la expresión nivel del gen de interés *CDR13*, el cual se asocia a mecanismo de resistencia constitutiva en plantas los primers empleados para este gen fueron *CDR13* F: CAAGCTGATATAATACCCAATATCGGAG, R: GAGGCTCGCACTGCGT (Fu *et al.*, 2016, Rawat *et al.*, 2017). Los genes de referencia se evaluaron con el análisis de los datos de cuantificación relativa obtenidos por qPCR procesados con CFX Manager™ Software 3.1 de BIO-RAD, calculando la estabilidad de los cinco genes de referencia con el software Bio-Rad CFX Maestro™ Software de BIO-RAD.

**Cuadro 1.3.** Genes constitutivos de eucariotas, candidatos a genes de referencia para estudios de expresión génica usados en este estudio.

Gen	Primer 5' - 3'	Sintetiza	Cita
<b>Actina</b> ( <i>Actin</i> )	F:CTGAGCGTGGCTATTCCT TC	Componente de microfilamentos, regula la interacción entre filamentos de actina y otras fibras de proteínas que actúan como agentes de unión	Zhang <i>et al.</i> , 2005; Fu <i>et al.</i> , 2016
	R:GACTTCAGGACAGCGGA AAC		
<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</b> ( <i>GAPDH</i> )	F:GGAAGGTCAAGATCGGA ATCAA	Enzima que interfiere en la óxido-reducción en el proceso de glicólisis	Quiñones <i>et al.</i> , 1995, He <i>et al.</i> , 2006, Mafra <i>et al.</i> , 2013
	R:CGTCCCTCTGCAAGATGA CTCT		
<b>18S ARNr</b>	F:TTGGAAACTCTTTCGCCA CT	Subunidad del ARN ribosomal, involucrado en La transcripción de aminoácidos	Quiñones <i>et al.</i> , 1995, He <i>et al.</i> , 2006, Yan <i>et al.</i> , 2012
	R:AGCAGACCTGGCTATTAT ACGACTG		
<b>Enzima citocromo oxidasa</b> ( <i>Cox</i> )	F:GTATGCCACGTCGCATTC CAGA	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, He <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2006
	R:GAATGCCCTTAGCAGTTT TGGCT		
<b>F-Box</b>	F:TTGGAAACTCTTTCGCCA CT	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
	R:AGCAGACCTGGCTATTATA CGACTG		

### Estandarización de qPCR

La amplificación para los cinco genes candidatos a referencia (Cuadro 3) y el gen de interés *CDR13* se realizó por qPCR empleando C1000 Touch™ (Bio-Rad). Para cada gen, se probaron 20 y 10 uL de volumen final de reacción, ambas mezclas contenían: 1X de SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (2X). Se evaluó 200, 250 y 500 nM de cada primer y 50 ng de ADNc. La configuración de experimento consistió en tres replicas técnicas para cada réplica biológica por condición fitosanitaria, las cuales se amplificaron para cada gen de referencia versus el gen de interés, se adicionó el mismo número de NTC (not target control) para cada primer. Se evaluó la

eficiencia de amplificación de cada primer mediante un rango dinámico de  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^{-1}$  ADNc con factor de dilución 1:10.

### **Protocolo de amplificación**

Se evaluaron dos programas de termociclaje: el primero consistió en una desnaturalización a 95 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos 95 °C por 5 s y un alineamiento donde se evaluó un gradiente de temperatura de 57 a 60 °C por 30 s. En el segundo programa se probó una desnaturalización a 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s y un alineamiento a 57 °C por 40 s.

### **Curvas de disociación**

Para ambos programas de amplificación se probaron tres diferentes curvas de disociación: A) 70.0-85.0 °C +/-0.5 °C /ciclo, B) 60.0 °C- 95.0 °C +/-0.5 °C /ciclo, C) 65.0-95.0 °C +/-0.5 °C/ciclo. La cuantificación del ciclo de amplificación (Cq) para cada muestra y la temperatura melting (Tm) fueron considerados para la optimización de la RT-qPCR.

Además de la Tm con un solo pico de amplificación, se verificó la amplificación específica del fragmento esperado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% preparado en tampón TBE 1X, el cual fue sometido a 110 voltios durante 40 min. Finalmente se visualizó en el fotodocumentador UVP Biolmaging Systems.

## **1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Cuantificación y calidad de ARN**

El método de CTAB 2% utilizado para la extracción de ácidos nucleicos totales permitió obtener concentraciones de 200 -1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (Cuadro 1.4) a partir de nervadura central de *C. sinensis*. En todas las muestras las cantidades obtenidas fueron suficientes para realizar la homogenización a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , este paso es indispensable para la correcta comparación de expresión diferencial entre los genes evaluados evitando sobre o subestimarlos. En cuanto a las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro de la relación de absorbancia (A260/280) se obtuvieron lecturas de 1.93-2.01 (Cuadro 4), mostrando, la calidad y pureza de los ácidos nucleicos dentro de los rangos aceptables 1.8 -2.0, cantidades menores a este rango evidencian la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes (Wilfinger *et al.*, 1997, Taylor *et al.*, 2015).

**Cuadro 1.4.** Cantidad y calidad de ácidos nucleicos totales obtenidos de nervadura en hojas de *Citrus sinensis*.

Identificación	Conc. Acid Nucleic (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Relación A260/280 <sup>1</sup>	Relación A260/230 <sup>1</sup>
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

<sup>1</sup>=Longitud de onda de absorción de los ácidos nucleicos/proteínas (Luz UV)

La integridad del ARN generalmente se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, que produce un cierto patrón de bandas. Normalmente, las imágenes en geles muestran dos bandas integradas por la subunidad 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr) y otras especies de bandas más pequeñas que se encuentran del ARN (Schroeder *et al.*, 2006). La estimación de la concentración de ARN por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio es considerado por algunos autores (Sambrook *et al.*, 1989) como la medición más precisa de calidad y cantidad del ARN, con mayor razón cuando hay impurezas como proteínas y fenol, puesto que es una observación directa, aunque tiene desventaja de ser estrictamente visual (Alvarado *et al.*, 2000), sin embargo, debido a que la RT-qPCR utiliza moléculas indicadoras fluorescentes para controlar la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR, combinando los pasos de amplificación y detección de ácido nucleico en un ensayo homogéneo, elimina la necesidad de electroforesis en gel para detectar productos de amplificación (Bustin *et al.*, 2005).

### Retrotranscripción

Posterior a la de extracción de ARN total, se realizó la síntesis de ADNc por medio retrotranscripción en dos pasos, empleando un protocolo no comercial. Mostró que el ensayo 5 a

44 °C por 100 min, fue el mejor debido a que prolongó el tiempo de síntesis de la enzima, obteniendo en promedio concentraciones de 1069 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . El resto de los ensayos obtuvieron rendimientos promedio menores: ensayo 1 y 4) 666-680 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , mientras que los ensayos 2 y 3) 865- 880 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  respectivamente.

En el 40% de los ensayos de RT-qPCR, se usa Oligo-dT para cebar debido a que se hibrida a las colas de poly A de los ARNm en comparación con un cebador aleatorio. Además, es la opción más adecuada cuando se pretende amplificar varios ARNm objetivos de una muestra de ARN limitada (Bustin *et al.*, 2005). Es indispensable contar con un óptimo rendimiento que garantice la cantidad suficiente de ADNc para las amplificaciones con múltiples primers, reduciendo los reactivos y consumibles empleados por muestra.

### **Validación de la qPCR, determinación de condiciones de reacción**

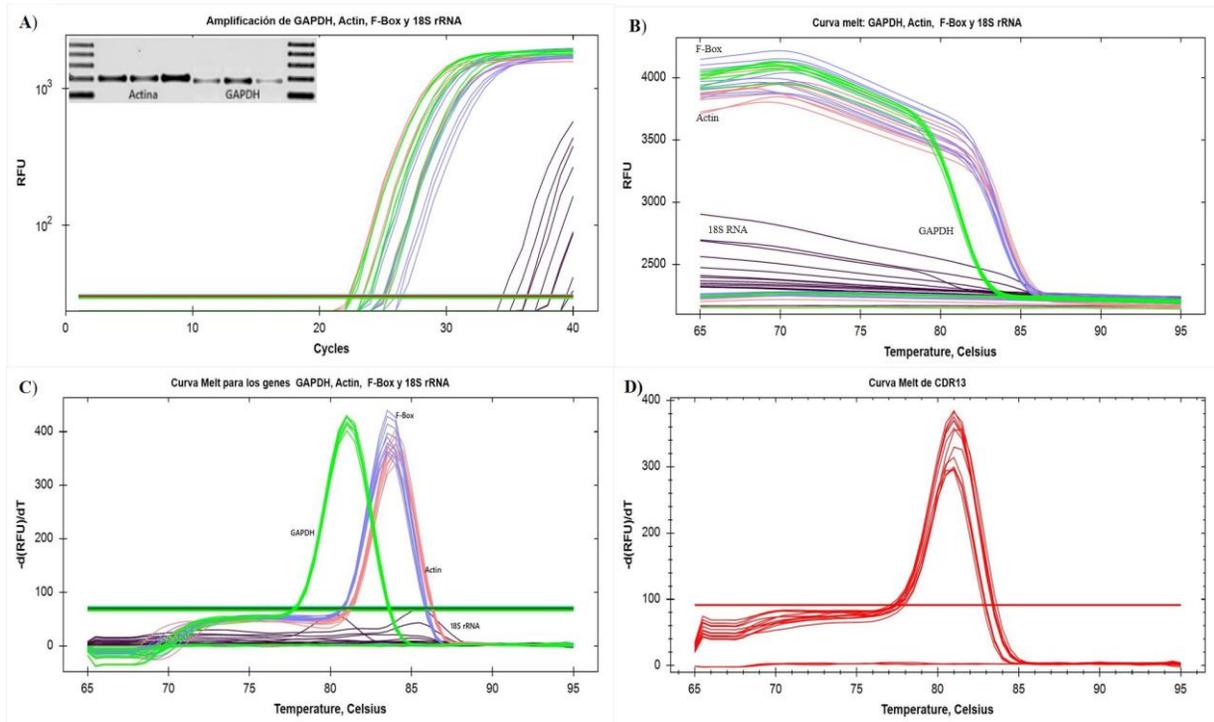
Para el protocolo de amplificación de qPCR se seleccionó el volumen final de reacción de 10  $\mu\text{L}$  con 500 nM de cada primer y 1X de SsoAdvanced Universal SYBR® Green ya que reduce la cantidad de reactivos sin afectar los Cq (Ciclo de cuantificación) o Tm (temperatura melting). El perfil térmico elegido fue una desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 s seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 5 s, 60 °C durante 30 s y curva Melting de 65–95 °C  $\pm$  0.5 °C/ciclo, favoreciendo la amplificación simultánea de los genes Actin, *GADPH*, 18S ARNr, F-Box y *CDR13*, no así para el gen Cox.

Las curvas de amplificación para los genes Actin y *GADPH* mostraron Cq constantes entre 23-25 con 3500-4200 RFU (Unidades relativas de fluorescencia) para las tres condiciones fitosanitarias evaluadas. Por su parte F-Box presentó Cq entre 25-28 con similar RFU. Mientras que el gen 18S ARNr fue descartado debido a los Cq tardíos de 36-40 con 600 RFU (Figura 1-A), impidiendo su uso en la normalización con el gen *CDR13*.

### **Curvas de disociación**

El empleo de SYBR® Green permitió el análisis de temperatura de disociación, característica de una amplificación específica para los genes *GAPDH* y *CDR13* a 81 °C, F-Box a 83.5 y Actin 84 °C (Figura 1 C y D), las cuales se disocian a una temperatura más alta que los artefactos inespecíficos como dímeros de primer (Ririe *et al.*, 1997). La ausencia del pico en la Tm indica que las condiciones de reacción no son óptimas para la amplificación del fragmento esperado como ocurrió para los genes 18S ARNr (Figura 1) y Cox, por lo que se excluyeron de este estudio para

su posterior análisis. La presencia de productos inespecíficos se observaría como un doble pico en las muestras de estudio o amplificación en los NTC que podrían ser causados por la unión del primer a un sitio inespecífico de los múltiples ARNm presentes o formación de dímeros. La eficacia de la PCR depende en gran medida del diseño de los primers utilizados (Bustin *et al.*, 2009). Además de la  $T_m$ , la visualización de los fragmentos amplificados (~200 pb), confirman la especificidad de los primers empleados en los genes Actin, *GADPH* con las tres condiciones fitosanitarias (Figura 1.1 A).



**Figura 1.1.** A) Gel de agarosa al 1.5 % fragmentos amplificados de aproximadamente 200pb, amplificación por qPCR empleando SYBR® Green para los genes *GADPH* (verde), *F-Box* (azul), *Actin* (rosa), *18S ARNr* (morado). B) Curva de disociación. C y D) Temperatura melt para genes *GADPH*, *F-Box*, *Actin*, *18S ARNr* y *CDR13*, en tres plantas por cada condición fitosanitaria estudiada.

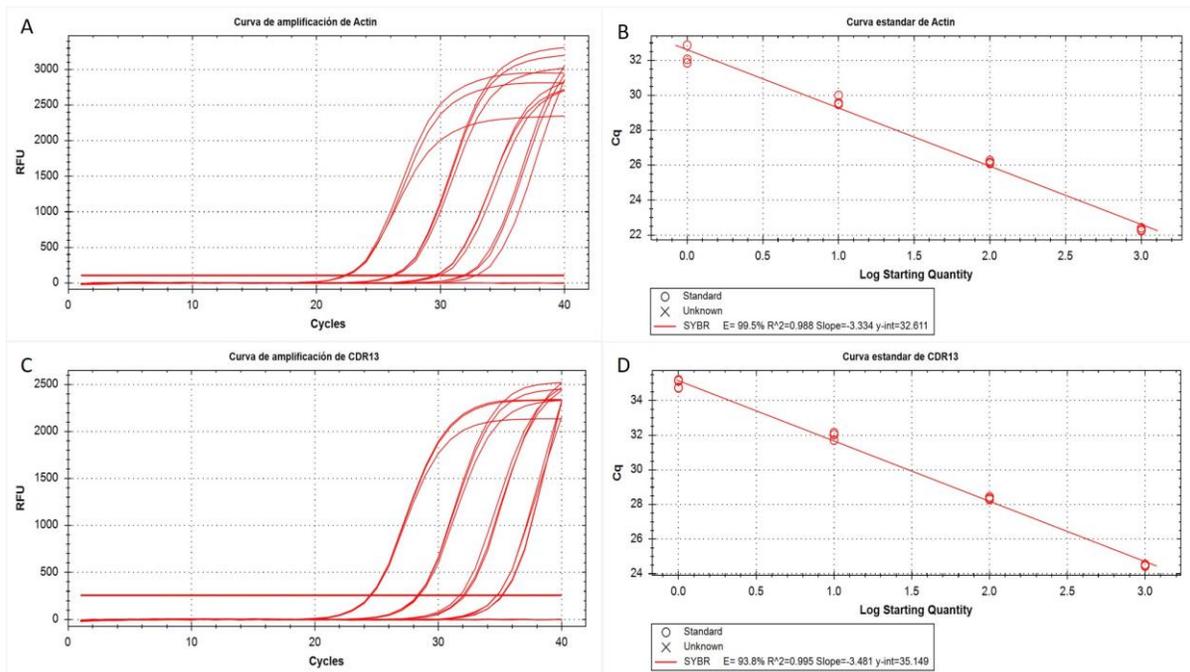
### Eficiencia de la qPCR

Es una media de velocidad a la que la polimerasa convierte los reactivos (dNTP, oligonucleótidos, y ADNc molde) en amplicones (Taylor *et al.*, 2015), este parámetro se encuentra directamente relacionado con la precisión del ensayo de qPCR. El rango dinámico de ADNc  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^0$  ng  $\mu\text{L}^{-1}$  permitió establecer los cuatro puntos mínimos requeridos para la construcción de las curvas

estándar, necesarios para la cuantificación relativa en los estudios de expresión génica (Brookman-Amissah *et al.*, 2015).

Se observó el incremento exponencial, donde la relación de cantidad de templado es inversamente proporcional al Threshold cycle (Ct), la comparación en tiempo real de la concentración relativa de templado (Figura 2 A-C). En los rangos dinámicos del gen Actin y *CDR13* no fue posible detectar la concentración  $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  del ADNc, determinando que  $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  es el umbral mínimo de concentración necesario para la detección con las condiciones anteriormente descritas.

En este ensayo la regresión lineal versus el logaritmo de las concentraciones objetivo mostró una pendiente negativa (Slope) = -3.332 y -3.48, un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) de 0.980 y 0.998 y una eficiencia de reacción (E) de 91 y 106% para el gen de Actin y *CDR13* respectivamente (Figura 2 B y D). La  $R^2$  representa la exactitud de los datos experimentales ajustados a regresión lineal, que a su vez proporciona una medida de la variabilidad entre réplicas, relaciona la eficiencia de amplificación para diferentes números de copias de plantillas iniciales. Se consideran que una eficiencia de reacción (E) de 90 a 110% y un  $R^2 > 0.990$  son aceptables en la evaluación de eficiencia de qPCR (Taylor *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante evaluar la eficiencia de cada primer, ya que el ARNm templado no es homogéneo y la cuantificación absoluta o relativa puede verse alterada, por este componente.

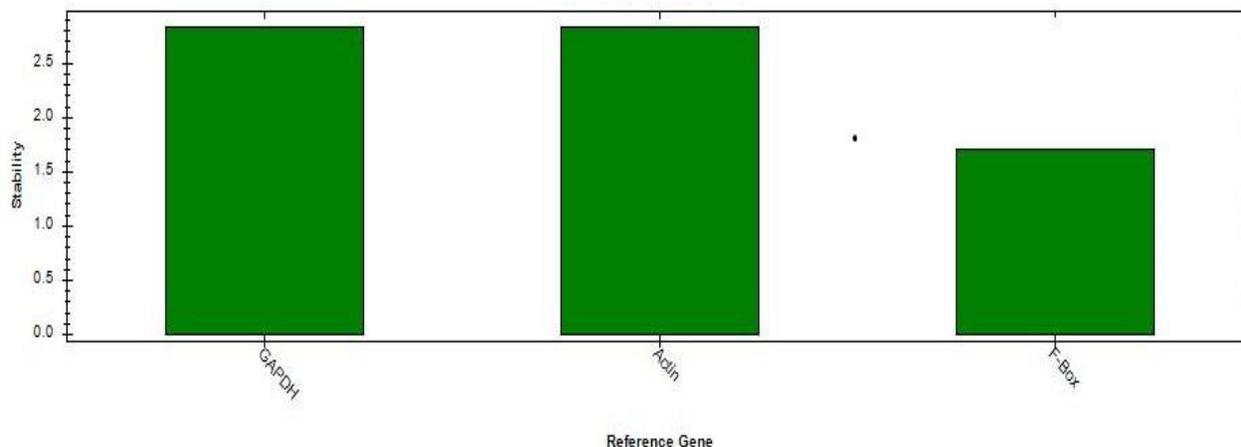


**Figura 1.2.** A y C) Curvas amplificación por qPCR de las muestras estándar  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^0$  de ADNc total para el gen Actin (Act3) y CDR13. B y D) Curva estándar con valores de eficiencia, R<sup>2</sup> y pendiente (slope) para ambos genes.

### Gen de referencia

El uso de genes de referencia es la solución más apropiada para el problema de normalización (Bustin *et al.*, 2005). En la figura 3, se observa la estabilidad de los genes *GAPDH* y *Actin* con valores de 2.5 en contraste con 1.5 estimado para F-Box, determinado por la variación en la amplificación de las muestras empleadas, la cual no fue influenciada por la condición fitosanitaria. Según Vandesompele *et al.* (2002) el valor de la estabilidad representa el gen de referencia para tomarlo como base para estudios específicos. En este estudio los genes *Actin*, *GAPDH* y *F-Box* son considerados ideales para emplearse como genes de referencia en este estudio por presentar mayor estabilidad, estos resultados contrastan con los obtenidos por Mafra *et al.* (2012), quienes evaluaron un conjunto de genes, entre los que se incluían, *Actin*, *GAPDH*, *F-Box* y *18S ARNr* en diferentes especies cítricas y porta injertos, en los que los análisis catalogaron únicamente F-Box dentro del grupo de los genes de referencia superiormente estables. Por su parte Yan *et al.* (2012) reportan a *18S ARNr* y *ACTB* como los más estables al emplear hojas de diferentes genotipos de cítricas. En nuestro estudio se descartaron a *Cox*, por su ineficiente amplificación con las condiciones de qPCR probadas y al gen *18S ARNr* debido a la excesiva variación de las muestras.

Cabe hacer mención que existe un flujo constante de publicaciones que defiende el uso de uno u otro gen de referencia individual, generalmente para una aplicación cada vez más especializada (Bustin *et al.*, 2005). Lo anterior, demostró que se requiere valoración previa de los genes, condiciones de reacción y primers utilizados en función al tipo de muestra del ensayo a desarrollar.



**Figura 1.3.** Agrupamiento de genes candidatos para emplearse como referencia, en relación a la estabilidad presentada en hojas de naranjo dulce bajo tres condiciones fitosanitarias: sanas, positivas a CLas y CTV.

## 1.6 CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo no comercial de RT-qPCR para la cuantificación relativa de *CDR13* empleando como genes de referencia: *GAPDH*, *Actin* y *F-Box* para la normalización de estudios de expresión génica diferencial, de extracciones de ARN de nervadura central de hojas *Citrus sinensis* con tres condiciones fitosanitarias: sana, positiva a CLas y positiva a CTV. Fue indispensable la homogenización de ARN. Para conseguir la síntesis de  $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADNc fue necesario:  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ARN, 500 U de M-MLV Reverse Transcriptase, sin embargo, el factor primordial fue aumentar a 100 min el tiempo de incubación, prolongando la actividad de la enzima. La optimización principal de la mezcla de reacción para qPCR fue la reducción a  $5 \mu\text{L}$  de SsoAdvanced™ SYBR® Green supermix (Bio-Rad) con un volumen final de  $10 \mu\text{L}$ , lo cual no altera los Cq esto permite la reducción en los costos en reactivos. La configuración de experimento consistió en tres replicas técnicas para cada réplica biológica por condición fitosanitaria, las cuales se amplificaron para cada gen de referencia versus el gen de interés y NTC por triplicado por gen, para discriminar posibles falsos positivos.

El programa de termociclaje permitió la amplificación simultánea exitosa de los genes analizados. Las curvas de disociación reflejaron la optimización de la qPCR, mostrando un único pico asociado a un amplicón específico, confirmado mediante electroforesis. El rango dinámico de ADNc permitió la construcción de una curva estándar con eficiencias del 91 y 106%,  $R^2$  de 0.980 y 0.998, mientras que la pendiente negativa (slope) fue de -3.33 y -3.48 respectivamente.

## 1.7 LITERATURA CITADA

- Alvarado GO, Martínez GJ, Pereyra SJP y Rocha PMA. 2000. Comparación de Métodos de Extracción de RNA para la Detección del Viroide Exocortis de los Cítricos por Electroforesis Secuencial. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(1):42-48. ISSN: 0185-3309 <https://www.redalyc.org/pdf/612/61218106.pdf>
- Brookman-Amissah N, Packer H, Predrigger H and Sabel J. 2015. Prime Time qPCR Application Guide Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting. Integral DNA Technologies 4a Ed. 98p. <https://docplayer.net/11548448-Primetime-qpcr-application-guide-experimental-overview-protocol-troubleshooting-fourth-edition.html>
- Bustin SA, Benes J V, Garson JA, Hellemans J, Huggett M, Kubista R, Mueller T, Nolan M, Pfaffl GW, Shipley L, Vandesopele V and Wittwer CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of quantitative Real-Time PCR Experiments *Clinical Chemistry* 55(4):611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin SA, Benes TV, Nolan M and Pfaffl. 2005. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193. <https://www.gene-quantification.de/bustin-2000.pdf>
- Chen H, Palmer I A, Chen J, Chang M, Thompson S L, 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* 136:5 <https://dx.doi.org/10.3791/57240>
- Dawson W, Bar-Joseph M, Garnsey S and Moreno P. 2015. Annual Review of Phytopathology 53: 137-155. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ., Manzanilla-Ramírez M A y Flores-Sánchez J. 2012. Análisis histológico en limón persa, limón mexicano y naranja dulce asociados a síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782. ISSN 2521-9766 <https://www.colpos.mx/agrocienc/Bimestral/2012/nov-dic/art-3.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. ISSN 2007-8080 <https://www.rmf.smf.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>
- 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):152-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.007>
- Kaczmarczyk A, Bowra S, Elek Z and Vincze E. 2012. Quantitative RT-PCR based platform for rapid quantification of the transcripts of highly homologous multigene families and their members during grain development. BMC Plant Biology 12(184):1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-184>
- 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):104-15. <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>
- Loeza-Kuk E, Ochoa Martínez D, Mora-Aguilera G, Rivas Valencia P, Gutiérrez-Espinosa MA, Cintra de Jesús Junior W, Villegas-Monter A, and Arno Wulff N. 2008. Detection of *Citrus sudden death-associated virus* and haplotypes of *Citrus tristeza virus* in *Toxoptera citricida*

- and *Aphis spiraecola* and implication on citrus sudden death in Brazil. *Agrociencia* 42: 669-678. ISSN 2521-9766 <https://www.redalyc.org/pdf/302/30211218007.pdf>
- 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>
- 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. 2014. Current situation and Perspectives for Management of Citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 108-119. ISSN: 0185-3309 <https://www.rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-203.pdf>
- Pfaff MW, Horgan WG and Dempfle L. 2002. Relative Software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression result in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30(9):10p. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- 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* 4:1-8. <http://dx.doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245(2): 154-60. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- 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.  
ISSN 2007-0934

- 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/r.rchsh.2012.01.005>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal J, Medina-Urrutia VM y Sanches-Stuchi E. 2018. Experiencias sobre el huanglongbing en limón mexicano en el estado de Colima, México. Citrus Research & Technology 39,e1039  
ISSN 2236-3122 <https://dx.doi.org/10.4322/crt.16518>
- Sambrook J, Fritsch FE and Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition. New York, USA. 1626 p.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassman M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M and Ragg T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Molecular Biology 7(3): 10-13.  
<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- SIAP. El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2019. Panorama agroalimentario 2019. 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)
- 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. Tech Note, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA 94547. Bulletin 5859 Ver. E.8p.  
<https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2010.01.005>
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Peape A and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3: research0034.1. doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- 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>
- Wilfinger WW, Makey K and Chomczynski P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity *Biotechniques* 22(3):474-481. <https://dx.doi.org/10.2144/97223st01>
- Xu G, Ma H, Nei M, 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>
- Zhang WM, Zhang Y, Zhang LH, Wang SG, Zhu TY, Lin D and Ma GZ. 2005. Nucleotide sequence and mRNA expression analysis of  $\beta$ -actin gene in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Physiology and Biochemistry* 31:373-383. <https://doi.org/10.1007/s10695-005-4743-7>



## CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN NARANJO DULCE (*Citrus sinensis*) EN RESPUESTA A CLAs

### 2.1 RESUMEN

El Huanglongbing (CLAs) es un patógeno capaz de generar infecciones sistémicas, que afecta la producción de cítricos a nivel mundial, disminuyendo gradualmente la calidad, rendimiento y eventualmente causar la muerte de los árboles. Sin embargo, el nivel de severidad es dependiente de múltiples factores como las cepas del patógeno, la susceptibilidad del hospedante y el manejo del mismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar las diferencias transcriptómicas de *TIR-NBC-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY70*, *CDR13* y *PP2-B13* en plantas de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) injertadas sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium*), en respuesta al estrés del inoculo mediante injerto de; una cepa asintomática (CLAs-A), una cepa sintomática (CLAs-S) y como testigo comparativo una variante tipo T30 (CTV) asintomático, por RT-qPCR. Los periodos de evaluación de expresión génica fueron; día del injerto (Testigo), 6 meses después del injerto (6T), 12 meses después del injerto (12T), se emplearon tres réplicas biológicas por tratamiento. La extracción de ARN total de nervadura central de hojas, se realizó con el método del CTAB al 2%. La expresión normalizada se determinó con el método de  $\Delta\Delta Cq$ , con *Actin* y *GADPH* como genes de referencia. La detección de los patógenos fue por qPCR siendo positivos de forma asincrónica a los 3.5 meses después de la inoculación (MDI), 4.5 MDI, 6 MDI, para CTV, CLAs-S y CLAs-A respectivamente. En el análisis de expresión génica, la mayor expresión de *TIB-ARC-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY70* y *PP2-B13* fue mayor en plantas inoculadas con CLAs-A en 6T respecto a CLAs-S. La mayor expresión de los genes en relación al tiempo en plantas inoculadas con CLAs-S fue al 12T. Para *CDR13* la expresión presentó una tendencia similar para CLAs-A y CLAs-S. Para el caso de las plantas inoculadas con variante tipo T30 (CTV) la expresión para los cinco genes evaluados superó a las registradas en las plantas inoculadas con ambas cepas de CLAs.

**Palabras clave:** Transcriptoma, RT-qPCR, cítricos, interacción planta-patógeno

# ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN SWEET ORANGE (*Citrus sinensis*) IN RESPONSE TO CLAs AND CTV

## 2.2 ABSTRACT

Huanglongbing (CLAs) is a pathogen capable of generating systemic infections, which affect citrus production worldwide, gradually decreasing the quality, yield, and eventually causing the death of trees. However, the level of severity is dependent on multiple factors such as the strains of the pathogen, the susceptibility of the host, and its management. The objective of this work was to evaluate the transcriptomic differences of *TIR-NBC-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY70*, *CDR13* and *PP2-B13* in sweet orange (*Citrus sinensis*) plants grafted on sour orange (*Citrus aurantium*), in response to stress. Of the inoculum by grafting of; an asymptomatic strain (CLAs-A), asymptomatic strain (CLAs-S), and as a comparative control an asymptomatic T30 type variant (CTV), by RT-qPCR. The gene expression evaluation periods were; graft day (Control), 6 months after graft (6T), 12 months after graft (12T), three biological replicates per treatment were used. The extraction of total RNA from the midrib of leaves carried out with the 2%CTAB method. The normalized expression defined with the  $\Delta\Delta Cq$  method, with *Actin* and *GADPH* as reference genes. The pathogens were detected by qPCR, being asynchronously positive at 3.5 months after inoculation (MDI), 4.5 MDI, 6 MDI, for CTV, CLAs-S, and CLAs-A respectively. In the gene expression analysis, the highest expression of TIB-ARC-LRR, NB-ARC, WRKY70, and PP2-B13 was higher in plants inoculated with CLAs-A in 6T with respect to CLAs-S. The expression higher of the genes in relation to time in plants inoculated with CLAs-S was at 12T. For *CDR13* the expression showed a similar trend for CLAs-A and CLAs-S. In the case of the plants inoculated with the T30 type variant (CTV), the expression for the five genes evaluated exceeded those registered in the plants inoculated with both strains of CLAs.

**Additional keywords:** Transcriptome, RT-qPCR, citrus, plant-pathogen interaction

## 2.3 INTRODUCCIÓN

Las afectaciones de problemas fitosanitarios como el Huanglongbing o HLB (CLas) y *Citrus Tristeza Virus* (CTV), en la producción de cítricos a nivel mundial, en la calidad, rendimiento y eventualmente causar la muerte de los árboles. La presencia de estas enfermedades puede ocasionar restricciones en la movilización y comercialización de material vegetativo y fruta fresca (SENASICA, 2020). El HLB es causado por la bacteria Gram-negativa llamada *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), un parasito obligado limitado al floema, cuyo vector es *Diaphorina citri* (Miles *et al.*, 2017). A nivel mundial, el impacto de esta enfermedad varía con pérdidas del 26% de la producción en Brasil (Bassanezi *et al.*, 2011), mientras que en México, se calcularon pérdidas económicas de 50% en la producción de limón mexicano en el Estado de Colima (Robles *et al.*, 2018) y del 17.3% en limón persa en Yucatán (Mora *et al.*, 2016).

Los principales factores que contribuyen a la rápida propagación del HLB son las múltiples generaciones del vector, la falta de resistencia natural de los hospederos y la limitada identificación de variedades resistentes (da Graça *et al.*, 2015). Derivado de lo anterior, se ha encontrado que el control químico del vector, mediante ARCOS (Áreas de control regional) ha sido un componente fundamental para el manejo de la enfermedad, así como la eliminación de material enfermo para evitar la dispersión de la enfermedad y uso de plantas certificadas (Halberth y Manjunath, 2004, Mora *et al.*, 2014). Con base a lo anterior las estrategias de control actuales se centran en vigilar la presencia del vector *D. citri* y/o la presencia de síntomas, que generalmente se inician cuando los árboles se vuelven sintomáticos, desde 3.5 meses en invernadero hasta varios años después de la infección inicial (Lee *et al.*, 2015, Esquivel 2016).

La tristeza de los cítricos causada por el *Citrus Tristeza Virus* (CTV) que es un Closterovirus transmitido por áfidos, se ha catalogado como otra de las enfermedades virales en cítricos más importantes de los últimos tiempos. Y donde las afectaciones epidémicas que han causado una severa disminución o la muerte de millones de árboles en áreas donde el naranjo agrio (*Citrus aurantium*) se utilizó como portainjerto (Bar-Joseph *et al.*, 1989). El vector más eficiente es el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) debido a su gran abundancia y alta eficacia de diseminación de aislamientos altamente patógenos (Bar-Joseph y Dawson, 2008; SENASICA 2014, citado por SENASICA 2019). El síntoma más severo es la muerte rápida de árboles injertados sobre naranjo agrio, otros síntomas como la "picadura del tallo" del pomelo o los

naranjos dulces, los síntomas moderados no están relacionadas con un portainjerto específico y no provocan la muerte del árbol, pero a menudo se asocian con retraso en el crecimiento y baja productividad (Bar-Joseph y Dawson, 2008). Los aislamientos de CTV asintomáticos (T30) se utilizan para proporcionar protección cruzada contra picaduras del tallo, pero no contra la muerte rápida (Gal-on & Shibolet, 2006; Bar-Joseph y Dawson, 2008). En México, CTV se detectó por primera vez en 1983 en el Estado de Tamaulipas y en 1986 en Veracruz; ambos brotes fueron eliminados oportunamente. Sin embargo, posteriormente el virus fue reportado en otros estados de la República Mexicana (NAPPO, 2013). La incidencia de variantes severas de CTV se intensifica al interactuar con el pulgón café presente en 18 Estados en México (SENASICA, 2014 citado por SENASICA, 2019), el vector tiene la facultad de transmitir de manera eficiente las variantes del virus (SENASICA, 2019), y para 2016 y 2017 se detectaron razas severas de CTV en el Estado de Veracruz (SENASICA 2020).

Cuando las plantas se ven afectadas por circunstancias abióticas como: deficiencias nutricionales, sequía, frío, altas temperaturas, contaminación o por circunstancias de tipo bióticas como: plagas y/o patógenos, activan una cascada de señalización que desencadena la expresión de cientos de genes, que codifican proteínas y enzimas modificando la transcriptómica de las plantas diseñadas para detectar daños y organismos invasores y contener sus efectos (Stahl *et al.*, 2017; Hafiz *et al.*, 2019). Por lo anterior, la información a nivel molecular de la respuesta de las plantas al estrés son importantes, no sólo para comprender los mecanismos del establecimiento y progresión de una enfermedad, sino también para identificar posibles biomarcadores que puedan ser empleados para el diagnóstico y sobre todo para el mejoramiento genético de las plantas, a través del desarrollo de variedades tolerantes o resistentes. Actualmente las técnicas de microarrays, RNA-seq y RT-qPCR permiten estudiar los cambios en el transcriptoma (Martinelli *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2019). En cítricos se han realizado estudios de transcriptómica de ARNm, para explorar la expresión diferencial de genes, en los que se comparan genotipos sanos, infectados (en diferentes etapas), susceptibles, levemente resistentes y/o considerados tolerantes, en los que se sugiere que CLas (Mafra *et al.*, 2013, Yu *et al.*, 2017) y CTV modulan genes clave (Yang *et al.*, 2013, Fu *et al.*, 2017). Albrecht *et al.*, (2008) han identificando cambios de los genes expresados diferencialmente que pueden ser agrupados de acuerdo a la función biológica incluyendo defensa celular, transporte, organización celular, fotosíntesis y metabolismo de carbohidratos. En el presente trabajo se eligieron cinco genes involucrados en la

respuesta de la planta a la enfermedad y defensa del patógeno es decir *TIR-NBS-LRR* asociados con la expresión de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR) y *NB-ARC* relacionado a la unión de nucleótidos, ambos asociadas a la respuesta a los agentes patógenos (Fu *et al.*, 2016). Estas proteínas tienen un subdominio central de unión a nucleótidos o NBS (Nucleotide-Binding Site) y un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina o LRR (Leucine-Rich Repeat). El subdominio NBS, también denominado en ocasiones NB, forma parte de un dominio mayor llamado *NB-ARC* (Nucleotide Binding Adaptor) (Lukasik y Takken, 2009). Las proteínas *NB-ARC* forman una subclase de la superfamilia STAND (Signal Transduction ATPases with Numerous Domains), una clase de interruptores moleculares involucrados en multitud de procesos, tales como inmunidad, apoptosis y regulación transcripcional (Danot *et al.*, 2009). Debido a su estructura modular las proteínas STAND pueden funcionar simultáneamente como sensor, interruptor y factor de respuesta (Takken y Goverse, 2012). El factor de transcripción *WRKY70* que pertenece a una familia de genes que juegan un papel importante en las funciones que regulan el crecimiento y desarrollo de la planta y participan en las respuestas de defensa de varios tipos de plantas (Tian *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2020). Ameline-Torregrosa *et al.* (2008) identifican en la región corriente arriba (upstream) de los *NBS-LRR* cuatro elementos reguladores implicados en respuesta a patógenos o estreses de plantas: caja WBOX, asociadas con los factores de transcripción *WRKY* (Dong *et al.*, 2003). *CDR13* del producto del gen de resistencia constitutiva a enfermedades 1 (*CDR1*) de *Arabidopsis thaliana* es una proteinasa aspártica que ha sido implicada en la señalización de resistencia a enfermedades (Simões *et al.*, 2007; Rawat *et al.*, 2017) y *PP2-B13* relacionado con la codificación de la proteína del floema, La proteína 2 del floema (*PP2*) es una de las proteínas más abundantes de la savia del floema, con funciones en la unión de carbohidratos (Dinat *et al.*, 2003;). La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-qPCR) permite realizar estudios de los niveles de expresión génica presentes en la planta, es el método más sensible para la detección de ARNm en bajas cantidades (Bustin, 2000). El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta diferencial de los genes *TIR-NBS-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY70*, *CDR13* y *PP2-B13* en hojas de plantas de *C. sinensis* en tres diferentes tiempos; Testigo, 6T y 12T, usando como inóculo dos cepas positivas a CLas una asintomática (CLas-A), sintomática (CLas-S) provenientes de regiones de producción de naranjo en México y una cepa positiva asintomática T30 (CTV). En el supuesto de que existe una diferencia en la expresión de

los genes en las cepas de CLas y esta diferencia podría ser la condicionante de la condición asintomática.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del experimento

El presente estudio se llevó a cabo en Texcoco Edo de México, en Colegio de Postgraduados Campus Montecillo localizados a 19.46 ° N, 98.90 ° O y a 2,250 msnm. Las plantas para su desarrollo y estudio se colocaron en los invernaderos de cristal, con temperaturas promedio de 18 °C, máxima de 42 °C y mínima de 3 °C, humedad relativa promedio de 31%, máxima de 78% y una mínima de 10%.

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de naranjo dulce (*C. sinensis*) var. Valencia Campbell injertado sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium*) de 18 meses de edad libres a CLas y CTV. Se mantuvieron en los contenedores (bolsa negra) y el sustrato proveniente del vivero.

### Inoculación

La inoculación de las plantas de los tres inóculos se realizó mediante injerto enchapado lateral e injerto de yema. La cepa sintomática positiva a CLas (CLas-S) es originaria de Jalisco y la cepa positiva a CTV es de Puebla, ambas se colectaron de la colección *in vivo* del INIFAP C.E-Tecomán de árboles de naranjo dulce (*C. sinensis*) injertado sobre naranjo agrio (*C. aurantium*) de 8 años de edad. La cepa asintomática a CLas (CLas-A) identificada en Veracruz se colectó en campo de árboles de naranjo dulce (*C. sinensis*) injertado sobre naranjo agrio (*C. aurantium*) de 10 años de edad aproximadamente. Ambos materiales fueron colectados en mayo del 2019, el material vegetativo fue previamente identificado positivo a los patógenos por el Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria de plagas en cítricos (LANREF-CP). Los tratamientos tuvieron tres repeticiones en arreglo factorial (inóculos) por 3 (tiempos).

### Tratamientos

Se formaron tres tratamientos: **1.** CLas-A, inóculo asintomático positivo a CLas (CLas-A) y negativo a CTV (CTV) y cuyos valores Cq para CLas fueron ~28.20; **2.** CLas-S; inóculo sintomático positivo a CLas (CLas-S) y negativo a CTV (CTV) con valores Cq a CLas de ~20.183.

CTV, como testigo comparativo una variante asintomática tipo T30 positivo a CTV con valores Cq ~25.03 y negativo a CLas y 4. Testigo, negativo a CLas y CTV. Se evaluaron tres repeticiones biológicas de cada tratamiento, la composición de cada tratamiento se realizó de acuerdo al cuadro 2.1.

**Cuadro 2.1.** Condiciones en la conformación de los tratamientos de las plantas de naranjo dulce empleadas en esta investigación.

Tratamiento	Origen	Edad	Condición	Detección Cq <sup>y</sup>	Repetición
Inóculo CLas-A	Injerto con cepa asintomática proveniente del Estado de Veracruz	10 años	Campo	positiva a CLas ~28.20 Cq <sup>y</sup> , Negativo CTV	3 plantas
Inóculo CLas-S	Injerto con cepa sintomática proveniente del Estado de Jalisco	8 años	Colección <i>in vivo</i>	positiva a CLas ~20.18 Cq <sup>y</sup> Negativo CTV	3 plantas
Inóculo CTV	Injerto con cepa proveniente del Estado de Puebla	8 años	Colección <i>in vivo</i>	positiva a CTV ~25.03 Cq <sup>y</sup> Negativo CLas	3 plantas
Testigo	Plantas vivero	de 18 meses	vivero	Negativo a CLas y CTV	3 plantas

<sup>y</sup>Cq= ciclo de amplificación

Desde la llegada del vivero al invernadero, las plantas se colocaron en jaulas dobles protegidas con malla antiafidos (Figura 2.1). La aclimatación de las plantas tuvo una duración de 12 meses, posterior a la inoculación se separaron por inóculo (tratamiento) en jaulas individuales, hasta el final del experimento. El manejo de las plantas, así como el riego (400 ml agua destilada), fertilización (urea y 12-12-17) y manejo de plagas (aspersiones foliar de abamectina y malation) fue igual para los tres tratamientos.



**Figura 2.1.** Ubicación de las plantas en jaulas, injerto enchapado lateral e injerto de yema en planta de naranjo dulce.

### **Muestreos y variables a evaluar**

Las muestras de tejido vegetal para los análisis de expresión de genes, consistieron en 4 hojas por planta considerando las cuatro orientaciones, estrato alto, medio y bajo (ver anexo) Los muestreos se realizaron en intervalos mensuales (meses después de la inoculación=MDI). Se evaluó la expresión de los genes en relación al tiempo después de la inoculación y entre inóculos, en tres tiempos para cada inóculo, al momento de la inoculación corresponde Testigo a 0 MDI, 6T a los 6 MDI y a 12T a los 12 MDI. Se analizaron tres replicas biológicas por inóculo, por cinco genes de interés, por dos genes de referencia, por tres tiempos diferentes.

### **Extracción de ácidos nucleicos**

Se tomaron cuatro hojas por planta en las cuatro orientaciones y estrato inferior, medio y superior, se realizaron en intervalos mensuales (meses después de la inoculación=MDI) hasta el tiempo 2.0 posteriormente quincenales (0.5), iniciando desde el momento de la inoculación corresponde al tiempo =Testigo, se analizaron tres tiempos, es decir; Testigo, 6T y 12T MDI (meses después de la inoculación). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de fruticultura del Colegio de Postgraduados- Campus Montecillo para el proceso de extracción de ácidos nucleicos. El aislamiento de ácidos nucleicos totales se hizo a partir de 0.1 g de nervadura central con el método CTAB 2% modificado por Hernández (2013), el rendimiento y calidad de ARN total obtenido ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) en cada una de las muestras se comprobó empleando el equipo NanoDrop 2000 (Zhejiang, China), con lecturas estándar de absorbancia entre 260/280 nm ( $A_{260/280}$ ).

### **Corroboración de infección**

La infección de los patógenos después del injerto con el inóculo se comprobó mediante la técnica molecular qPCR siguiendo los protocolos publicados por LANREF-CP (2015). La detección presencia/ausencia de CLas se realizó con los primer HLB-p y HLB-as (Li *et al.*, 2006) mediante qPCR. La detección de CTV se realizó empleando los primers P25-F/P25-R (Saponari *et al.*, 2007). La clasificación del genotipo de CTV se realizó empleando los primer de las razas T36, T30 y VT publicados por Roy *et al.* (2010). La muestra se consideró positiva para qPCR cuando los valores de Cq (ciclo de amplificación) fueron inferiores a 35.

### Síntesis de ADNc

El ARN total se diluyó a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y se procedió a obtener la síntesis de ADNc en dos pasos, el mix de reacción fue de 20  $\mu\text{L}$ : 0.5  $\mu\text{L}$  (1 mM) Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer (Promega), 3  $\mu\text{L}$  (50 ng) de ARN, 8.75  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, se incubó a 85 °C por 3 min. Después se agregaron 1.5  $\mu\text{L}$  (2 mM) de dNTP Mix (Promega), 4.5  $\mu\text{L}$  (5X) de buffer-RT (Promega), 1.5  $\mu\text{L}$  (10U) de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y 0.25  $\mu\text{L}$  (2U) de RNAsin (Promega) y se incubó a 44 °C por 60 min y 92 °C por 10 min.

### Detección de expresión de genes

Para evaluar el efecto de los inóculos en la expresión de genes se usaron los primers específicos de los cinco genes elegidos (Cuadro 2.2), como genes de referencia se usó *GAPDH* y *Actin* (ACT3). Antes de la detección, se probó la estabilidad de la expresión de los genes de referencia (*Actin*, *GAPDH F-Box*, *18S* ARNr y *COX*) para encontrar el mejor par de genes para normalizar la expresión niveles de los genes de interés, usando, el software Bio- Rad CFX Maestro se identificó *Actin* y *GAPDH* como el par de genes de referencia más estable para RT-qPCR de este estudio.

**Cuadro 2.2.** Primers específicos de los cinco genes de interés elegidos para RT-qPCR (Fu *et al.*, 2016).

Símbolo del gen	Primer sequence Forward/Reverse	Tm (°C)	Amplicon (bp)
<i>PP2-B13</i>	F: AGCAGATGGTGAAGTCAAGAC	59	164

CDR1	R: ACCCTTTACTTCCCTTAAACTCG F: TGGCGACCTTCTTGAGTTG	60	159
TIR-NBS-LRR	R: ATCGTTGGTAGGGAGTTTCAC F: AGTAGAAAGCTTGGAGGTGC	60	190
WRKY70	R: TCCTTCCCCTAGATCACAGTC F: TCTCGTGGCAAATATACTGAGC	60	198
NB-ARC	R: CTTCTCTTGTAGCATCCTCTCC F: ATTGGGTTAGCCTGAAGAGTG	60	198
	R: CCAGTCCCTTTTCAGCCTTAG		

## RT-qPCR

Se elaboró una sola mezcla de reacción, el mix para una reacción consistió en: 5  $\mu\text{L}$  de SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.5  $\mu\text{L}$  (0.5 mM) de cada primer y 1  $\mu\text{L}$  de ADNc (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) se aforó con H<sub>2</sub>O (libre de nucleasas) a 10  $\mu\text{L}$ . La amplificación se realizó con el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler, con el programa: 95 °C por 30 segundos, seguido de 39 ciclos de 95 °C por 5 s y 60 °C por 30 s, curva Melting 65 °C – 95 °C +/- 0.5 °C/ciclo. La cuantificación del ciclo de amplificación (Cq) para cada muestra y la temperatura melting fueron considerados para la optimización de la RT-qPCR. La eficacia del primer se determinó mediante una curva estándar de muestras de ADNc cuyo rango dinámico fue de  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^0$ . La amplificación fue seguida por análisis de curva de fusión para verificar la especificidad del producto de PCR. El coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) osciló entre 0.980 y 0.998, la eficiencia de la PCR varió de 91% a 106%. La configuración de la placa del experimento consistió (ver anexo) en tres replicas técnicas por cada réplica biológica por inóculo, por gen y NTC (not target control). Para confirmar la especificidad de la amplificación de una única banda y la ausencia de la formación de dímeros el producto amplificado para cada gen se analizó en geles de agarosa al 1.5%, después de ser teñido con bromuro de etidio se observaron en el transiluminador Epi Chemi II Darkroom UVP Bioluminescence Imaging Systems (ver anexo).

## Determinación de los cambios en la expresión génica

Los datos fueron analizados usando dos métodos:  $\Delta\text{Cq}$  y  $\Delta\Delta\text{Cq}$ . El método  $\Delta\text{Cq}$  permite calcular la cuantificación relativa en el que se calcula el nivel de expresión relativo de una secuencia objetivo (gen de interés), es decir la cantidad promedio de Cq para la muestra con el Cq promedio más bajo para el gen de interés del mismo tratamiento de muestra. El método  $\Delta\Delta\text{Cq}$  calcula la

expresión normalizada, es la cantidad relativa de un objetivo (gen) normalizada a las cantidades de los objetivos de referencia (genes o secuencias de referencia), este se calcula tomando la cuantificación relativa de una muestra, dividida entre la cuantificación relativa de los genes de referencia, en este caso empleamos los genes de referencia *Actin* y *GAPDH*, ambos métodos se analizaron con CFX Manager™ Software 3.1 de BIO-RAD.

### **Análisis estadístico**

Se generó una matriz de expresión génica en MS Excel por fuente de inóculo, tiempo de inoculación, gen, repetición y para los métodos de análisis  $\Delta\Delta Cq$  y  $\Delta Cq$  del CFX Manager™ Software 3.1 de BIO-RAD (ver anexos). En R-studio® y MS Excel se realizaron pruebas de medias mediante el método T-student con distribución de dos colas, suponiendo varianzas desiguales y un nivel de significancia de  $p < 0.05$  para comparar diferencias estadísticas de  $\Delta\Delta Cq$  y  $\Delta Cq$  y determinar si la presencia de un inóculo específico tuvo el mismo efecto de activación de genes en planta. El efecto del inóculo respecto al tiempo de la expresión de genes se comparó en los tiempos 6T y 12T vs testigo de cada inóculo. Se comparó el efecto de cada inóculo en el mismo tiempo es decir: CLas-S, CTV en 6T vs CLas-A 6T y CLas-S, CTV en 12T vs CLas-A 12T. La estructura matricial para cada método se analizó considerando tres escenarios: 1) empleando la media de las tres repeticiones biológicas, 2) el promedio dos repeticiones biológicas eliminando la repetición con el valor atípico (repetición-outlier) y 3) sustitución de valor outlier de las repeticiones biológicas por el promedio de las repeticiones consistentes.

## **2.5 RESULTADOS**

### **Detección del patógeno en material injertado**

La detección del inóculo CTV ocurrió a los 3.5 MDI; para CLas-S a los 4.5 MDI y para CLas-S el patógeno se detectó 6.0 MDI. Los resultados encontrados por Ramadugu *et al.* (2016), mencionan que los títulos el patógeno en la planta son bajos pues HLB tiene un largo período de incubación. En el presente estudio la diferencia del tiempo necesario para la confirmación de la infección en el huésped (planta) en los inóculos de CLas podría estar asociada a que se usaron diferentes fuentes de inóculo con diferentes títulos de bacterias.

### **Comparación de la expresión diferencial de los genes mediante el análisis de la expresión |normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) de los genes en el tiempo**

**Análisis incluyendo tres muestras biológicas** La expresión normalizada en el tiempo para los cinco genes analizados de cada tratamiento, se muestra en los cuadros 2.3, 2.4 y 2.5. En el Cuadro 2.3 se presentan los resultados de las plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos (CLas-A, CLas-S y CTV) en los tres tiempos (T, 6T y 12T) muestreados de las tres repeticiones biológicas empleadas en el experimento. Las plantas inoculadas con CLas-A mostraron diferencias significativas en la expresión normalizada al tiempo 6T en el gen *TIB-NBS-LRR* (1.37) comparado con su testigo (0.91) mientras que al tiempo T12 la expresión del gen disminuye. Las plantas inoculadas con CLas-S fueron significativas al T12 (0.94) comparados con su testigo CLas-S (0.46) y con su T12 (0.94). Los menores valores de expresión se encontraron en las plantas inoculadas con CLas-S 6T (0.43) mientras que los mayores valores para este gen se encontraron al inocular con CTV en el testigo (1.54) y en el tiempo 6T (2.06) sin embargo en el inóculo CTV no hubo diferencias significativas.

En relación al gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias en su expresión a los 12T en plantas inoculadas con CLas-S (0.38) comparadas con su testigo (0.24) y tiempo 6T (0.22). Los mayores valores de expresión se registraron en el testigo CTV (1.6) y a los seis meses del inóculo CTV (1.88) en tanto que a los 12 meses la expresión normalizada bajó a 0.46.

**Cuadro 2.3.** Análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) de cinco genes usando tres repeticiones biológicas en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación.

Gen	CLas-A <sup>1</sup>			CLas-S			CTV		
	Testigo <sup>2</sup>	6T	12T	Testigo	6T	12T	Testigo	6T	12T
<i>TIB-NBS-LRR</i>	0.91±0.05	1.37±0.11*** <sup>3</sup>	0.84±0.18	0.46±0.05	0.43±0.11	0.94±0.12**	1.54±0.58	2.06±1.67	1.08±0.02
<i>NB-ARC</i>	0.44±0.07	0.52±0.02	0.49±0.05	0.24±0.08	0.22±0.05	0.38±0.05**	1.6±0.73	1.88±1.46	0.46±0.03
<i>WRKY70</i>	0.79±0.08	0.88±0.04	0.66±0.09	0.64±0.09	0.31±0.10**	0.66±0.11	1.2±0.42	1.35±1.12	0.85±0.05
<i>CDR13</i>	0.39±0.14	0.4±0.02	0.24±0.02	0.43±0.05	0.3±0.14	0.33±0.08**	2.61±0.98	3.17±2.46	0.41±0.03*
<i>PP2-B13</i>	0.31±0.15	0.44±0.001	0.22±0.04	0.17±0.06	0.22±0.01	0.39±0.09	0.4±0.07	1.12±1.07	0.28±0.02*

<sup>1</sup> CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>2</sup> T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>3</sup> Niveles de significancia entre filas aplicados por cada gen y tipo de inóculo, entre filas \*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Para el factor de transcripción (FT) *WRKY70* se encontraron diferencias al tiempo 6T en las plantas inoculadas con CLas-S 6T (0.31) contra las inoculadas en su tiempo cero (0.64) y T12 (0.66). El mayor valor promedio de expresión se encontró en las inoculadas con CLas-A en el

tiempo 6 T (0.88) y el menor valor de expresión se presentó en las plantas inoculadas con CLas-S en el mismo tiempo (0.31).

Respecto al gen *CDR13*, se encontraron diferencias significativas al T12 en la inoculación con CLas-S (0.33) contra su Testigo (0.43). Las plantas inoculadas con CTV mostraron diferencias en la expresión a 12T (0.41) comparado con su Testigo (2.61). Los menores valores fueron encontrados al inocular con CLas-A al T12 (0.41) y el valor mayor de expresión se encontró al inocular con CTV a 6T (3.17).

En el gen *PP2-B13*, se encontraron diferencias significativas al T12 en las plantas inoculadas con CTV (0.28) respecto su Testigo (0.4). Los menores valores fueron encontrados en las plantas inoculadas con CLas-S Testigo (0.17) y el valor mayor de expresión se encontró al inocular con CTV 6T (1.2).

Los resultados muestran que las plantas inoculadas con CLas-A elevan sus valores de expresión al T6 en los cinco genes mientras que al tiempo T12 los valores bajan en todos los genes también. En las plantas inoculadas con CLas-S los valores de expresión al T6 se conservan muy parecidos a los valores de su Testigo (T). Al tiempo 12T suben en dos genes (*TIB-NBS-LRR* y *NB-ARC*) y se conservan en los demás genes.

**Análisis eliminando el valor atípico.** Para el gen *TIB-NBS-LRR* se encontraron diferencias significativas en el tiempo seis al inocular con CLas-A (1.37) contra los valores de su CLas-A Testigo (0.94) (Cuadro 2.4). Los menores valores de expresión normalizada se registraron al tiempo 6T al inocular con Clas-S (0.37) y los mayores valores se encontraron en el día cero al inocular con CTV (CTV-Testigo, 1.85) y en el tiempo 6T al inocular con CLas-A (1.37).

En el gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias al tiempo 6T de haber inoculado con CLas-A (0.52) contra su testigo (0.43), al tiempo 12T al inocular con CLas-S (0.48) contra CLas-S Testigo (0.29). Los menores valores de expresión normalizada se encontraron a 6T en las plantas inoculadas con Clas-S (0.24). Los mayores valores para este gen se encontraron en las plantas inoculadas con CTV en los tiempos testigo (1.95).

En el caso de *WRKY70* se encontraron diferencias al T6 al inocular las plantas con CLas-S (0.26) comparado con su Testigo (0.64). El mayor valor promedio de expresión se encontró para

el tiempo del testigo (día cero) al haber inoculado con CTV (1.42) mientras que los menores valores de expresión se encontraron en el tiempo 6T en las plantas inoculadas con CLas-S (0.26).

**Cuadro 2.4.** Análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) de cinco genes eliminando el valor atípico en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos en diferentes tiempos.

Gen	CLas-A <sup>1</sup>			CLas-S			CTV		
	Testigo <sup>2</sup>	6T	12T	Testigo	6T	12T	Testigo	6T	12T
<i>TIB-NBS-LRR</i>	0.94±0.01	1.37±0.110 <sup>3**</sup>	0.94±0.07	0.43±0.03	0.37±0.02	0.95±0.12	1.85±0.34	1.10±0.13	1.08±0.02
<i>NB-ARC</i>	0.43±0.07	0.52±0.02**	0.47±0.04	0.29±0.01	0.24±0.04	0.48±0.02*	1.95±0.57	1.04±0.04	0.46±0.03
<i>WRKY70</i>	0.75±0.06	0.91±0.001	0.66±0.09	0.64±0.09	0.26±0.04**	0.66±0.004	1.42±0.26	0.71±0.05	0.85±0.05
<i>CDR13</i>	0.31±0.02	0.41±0.01	0.24±0.08**	0.4±0.02	0.22±0.02**	0.33±0.08**	2.16±0.98	1.75±0.18*	0.42±0.03*
<i>PP2-B13</i>	0.22±0.03	0.44±0.001*	0.24±0.02	0.15±0.06	0.22±0.01	0.25±0.04	0.35±0.01	0.50±0.06	0.28±0.02**

<sup>1</sup> CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>2</sup> T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>3</sup> Niveles de significancia entre filas aplicados por cada gen y tipo de inóculo \*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Respecto al gen *CDR13*, se encontraron diferencias a 12T en las plantas de naranjo inoculadas con CLas-A (0.24) y 6T y 12T al inocular con CLas-S. Se encontraron diferencias a 12T al inocular con CTV (0.42) respecto al CTV Testigo (2.61). El menor valor de expresión normalizada se registró a 6T al inocular con CLas-S (0.22) y los mayores valores de expresión se registraron al inocular con CTV, en el Testigo y a 6T con 2.16 y 1.75 respectivamente.

Para el gen *PP2-B13*, se encontraron diferencias significativas a 6T en las plantas inoculadas con CLas-A (1.37) contra CLas-A testigo (0.22) y en 12T al inocular con CTV (0.28) contra CTV testigo (0.35). Los menores valores fueron encontrados en el tiempo Testigo al inocular con CLas-S (0.15) y el valor mayor de expresión se encontró a 6T al inocular con CTV (0.50).

Este segundo escenario de análisis estadístico muestra ligeros cambios en los valores de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) de los genes comparados con el escenario anterior, sin embargo arroja diferencias estadísticas al tiempo 6T en tres genes (*TIB-NBS-LRR*, *WRKY70* y *PP2-B13*) en plantas inoculadas con CLas-A y en dos genes (*WRKY70* y *PP2-B13*) en plantas inoculadas con CLas-S.

**Análisis con sustitución del valor atípico.** En el Cuadro 2.5 se presentan los resultados al haber sustituido el valor atípico de las repeticiones biológicas por el promedio de las repeticiones consistentes y el efecto de esta modificación en los resultados de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ )

de los cinco genes analizados. En el gen TIB-NBS-LRR se encontraron diferencias significativas a 6T en las plantas inoculadas con CLAs-A (1.37). En las plantas inoculadas con CLAs-S las diferencias se registraron a 6T con valores de expresión de 0.37. Al inocular con CTV los valores significativos fueron al tiempo T12 (1.08). Los menores valores de expresión se encontraron a 6T al inocular con CLAs-S (0.37) en tanto que los mayores valores para este gen se registraron en el tiempo testigo al inocular con CTV (1.85).

En relación al gen NB-ARC, se encontraron diferencias en las plantas inoculadas con CLAs-A al tiempo 6T (0.52) y al tiempo T12 (0.47) comparadas con su Testigo (0.39). Las plantas inoculadas con CLAs-S también fueron significativas al tiempo 6T (0.19) y al tiempo 12T (0.41) comparadas con los valores de su Testigo (0.29). Al inocular con CTV se obtuvieron diferencias al tiempo 6T (1.04) y al tiempo 12 (0.46) comparadas con su Testigo (1.22). Los mayores valores para este gen se encontraron al inocular con CTV Testigo (1.22) y los menores valores de expresión se encontraron al inocular con CLAs-S 6T (0.19).

Para WRKY70 se encontraron diferencias a 6T al inocular con CLAs-A (0.88), pero no así al tiempo T12 (0.62). Al inocular con CLAs-S hubo diferencias otra vez al tiempo 6T (0.26) más no al tiempo T12. El mayor valor promedio de expresión se encontró para el tiempo testigo al inocular con CTV (1.42) en tanto que el menor valor de expresión se registró a 6T al inocular con CLAs-S (0.26) al tiempo T6.

**Cuadro 2.5.** Análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) de cinco genes en plantas de naranja inoculadas con tres inóculos en diferente tiempo usando un valor corregido.

Gen	CLAs-A <sup>1</sup>			CLAs-S			CTV		
	Testigo <sup>2</sup>	6T	12T	Testigo	6T	12T	Testigo	6T	12T
TIB-NBS-LRR	0.94±0.01	1.37±0.11 <sup>3*</sup>	0.94±0.05	0.43±0.02	0.37±0.02 <sup>****</sup>	1.01±0.07	1.85±0.24	1.11±0.09	1.08±0.02 <sup>***</sup>
NB-ARC	0.39±0.02	0.52±0.02 <sup>**</sup>	0.47±0.03 <sup>*</sup>	0.29±0.01	0.19±0.02 <sup>***</sup>	0.41±0.05 <sup>*</sup>	1.22±0.32	1.04±0.03 <sup>**</sup>	0.46±0.03 <sup>*</sup>
WRKY70	0.75±0.04	0.88±0.04 <sup>*</sup>	0.62±0.04	0.59±0.03	0.26±0.03 <sup>***</sup>	0.59±0.13	1.42±0.18	0.71±0.04	0.85±0.05
CDR13	0.31±0.01	0.4±0.02 <sup>***</sup>	0.24±0.02 <sup>***</sup>	0.4±0.01	0.22±0.02 <sup>***</sup>	0.33±0.08 <sup>***</sup>	3.15±0.31	1.75±0.13 <sup>**</sup>	0.41±0.03 <sup>*</sup>
PP2-B13	0.22±0.02	0.44±0.001 <sup>***</sup>	0.24±0.01 <sup>**</sup>	0.2±0.01	0.22±0.01	0.25±0.03 <sup>**</sup>	0.35±0.01	0.5±0.04 <sup>**</sup>	0.28±0.02 <sup>*</sup>

<sup>1</sup> CLAs-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLAs-S= inóculo sintomático de CLAs; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>2</sup> T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>3</sup> Niveles de significancia entre filas aplicados por cada gen y tipo de inóculo \* =0.10 \*\* =0.05 \*\*\* =0.001 \*\*\*\* =0.0001

Respecto al gen *CDR13*, se registraron diferencias significativas a 6T (0.4) y 12T (0.24) al inocular con CLas-A comparado con su testigo CLas-A Testigo (0.31). Al inocular plantas de naranjo con CLas-S los valores de expresión fueron 0.22 al tiempo 6T y de 0.33 al tiempo 12T contra 0.4 registrado en el testigo. En las plantas inoculadas con CTV los valores de expresión fueron de 1.75 y 0.41 al tiempo 6T y 12T respectivamente, comparado con el valor de 3.15 en su testigo. Los menores valores fueron encontrados a los seis meses al inocular con CLas-S (0.22) y el valor mayor de expresión se encontró en el tiempo de inicio al inocular con CTV Testigo (3.15). Para el gen PP2-B13, se encontraron diferencias significativas al tiempo 6T (0.44) y 12T (0.24) al inocular con CLas-A contra su testigo (0.22). Al inocular con CLas-S el valor de expresión fue de 0.25 al tiempo 12T comparado con 0.2 registrado en su Testigo. En las plantas inoculadas con CTV los valores de expresión fueron de 0.5 y 0.28 a los 6T y 12T respectivamente contra 0.35 registrado en su testigo.

Los menores valores fueron encontrados en el tiempo de inicio al inocular con CLas-S Testigo (0.2) y el valor mayor de expresión se encontró a los seis meses al inocular con CTV (0.5). Los resultados de expresión de expresión normalizada en este tercer escenario muestran diferencias significativas en los cinco genes al inocular con CLas-A en los tiempos 6T y 12T. En cuatro genes al inocular con CLas-S en los tiempos 6T y 2T. También en cuatro de cinco genes al inocular con CTV en los dos períodos de tiempo.

### Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) de la expresión de los genes en relación al tiempo eliminado los genes de referencia

**Cuadro 2.6.** Análisis de la expresión de genes mediante la cuantificación relativa ( $\Delta Cq$ ) de cinco genes usando tres repeticiones biológicas en plantas de naranjo inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación.

Gen	CLas-A <sup>1</sup>			CLas-S			CTV		
	Testigo <sup>2</sup>	6T	12T	Testigo	S 6T	12T	Testigo	6T	12T
<i>TIBNBSLRR</i>	0.14±0.06	0.34±0.31	0.05±0.03 <sup>3*</sup>	0.11±0.09	0.07±0.06	0.09±0.04	0.06±0.04	0.52±0.45	0.22±0.04**
<i>NBACR</i>	0.13±0.07	0.26±0.25	0.07±0.04	0.12±0.12	0.06±0.05	0.1±0.06	0.30±0.05	0.53±0.44	0.26±0.06**
<i>WRKY70</i>	0.15±0.07	0.28±0.28	0.05±0.02	0.15±0.12	0.05±0.04*	0.08±0.02	0.08±0.05	0.53±0.44	0.05±0.02**
<i>CDR13</i>	0.16±0.03	0.30±0.30	0.05±0.02**	0.14±0.11	0.07±0.07	0.12±0.10	0.07±0.04	0.52±0.45	0.29±0.04***
<i>PP2B13</i>	0.13±0.09	0.29±0.28	0.06±0.04	0.14±0.15	0.1±0.06	0.17±0.06	0.11±0.07	0.53±0.43	0.28±0.05**

<sup>1</sup> CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

---

<sup>2</sup> T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>3</sup> Niveles de significancia entre filas aplicados por cada gen y tipo de inóculo \*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

**Análisis incluyendo tres muestras biológicas.** Para el gen *TIB-NBS-LRR* se encontraron diferencias significativas a 12T al inocular con CLAs-A (0.05) contra CLAs-A Testigo (0.14). Al inocular con CTV se registraron diferencias a 12T (0.22) contra su Testigo (0.06) (Cuadro 2.6). Los menores valores de cuantificación se encontraron a los 12T al inocular las plantas con CLAs-A (0.05) y los mayores valores para este gen se encontraron a 6T al inocular con CTV (0.52).

En el gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias a 12T al inocular con CTV (0.26) contra CTV Testigo (0.30). Los mayores valores para este gen se encontraron a 6T al inocular con CTV (0.53) y la menor cuantificación fue a 6T al inocular con CLAs-S (0.06).

En el caso del factor de transcripción (FT) *WRKY70* se encontraron diferencias a 12T al inocular con CLAs-S (0.05) contra su Testigo (0.15). También hubo diferencias al inocular con CTV a 12T (0.05) contra su Testigo (0.06). El mayor valor promedio de cuantificación se encontró a los seis meses al inocular con CTV (0.53) y el menor valor de cuantificación relativa registrado fue idéntico a los 12T al inocular con CLAs-A y a 6T al inocular con CLAs-S (0.05).

Respecto al gen *CDR13*, se encontraron diferencias significativas a los 12T al inocular con CLAs-A (0.05) comparado con su Testigo (0.16). Al inocular con CTV se registraron diferencias a 12T (0.29) comparado con su Testigo (0.07). Los menores valores fueron registrados a los 12T al inocular con CLAs-A (0.05) y el valor mayor de cuantificación relativa se encontró a 6T al inocular con CTV (0.52).

Para el gen *PP2-B13*, se encontraron diferencias significativas a 12T al inocular con CTV (0.28) comparado con su Testigo (0.11). Los menores valores fueron encontrados a 12T al inocular con CLAs-A (0.06) y el valor mayor de cuantificación se encontró a 6T al inocular con CTV (0.53).

El método de cuantificación relativa utilizando tres muestras biológicas muestra en general valores de expresión más bajos que el método de expresión normalizada.

**Análisis eliminando el valor atípico.** En el gen *TIB-NBS-LRR* se encontraron diferencias significativas a 12T al inocular con CLAs-A (0.07) comparado con su CLAs-A Testigo (0.17) al

inocular con CTV hubo diferencias a 12T (0.22) comparado con su CTV Testigo (0.09)(Cuadro 2.7). Los menores valores de cuantificación se encontraron a 6T al inocular con CLas-S (0.04) y los mayores valores para este gen se encontraron a 6T al inocular con CTV (0.27).

En relación al gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias a 12T al inocular con CLas-A (0.09) contra su testigo CLas-A Testigo (0.17). Las plantas inoculadas con CTV presentaron diferencias a 12T (0.26) contra su CTV Testigo (0.10). Los menores valores para este gen se registraron a 6T al inocular con CLas-S (0.03) y los mayores a 6T al inocular con CTV (0.3).

Para *WRKY70* se encontraron diferencias a 12T (0.05) al inocular con CLas-A contra su testigo (0.19). En CLas-S hay diferencias a 6Ts (0.02) comparado con su testigo (0.07). Al inocular con CTV a los 12T hay diferencias (0.05) contra CTV Testigo (0.11). El mayor valor de cuantificación relativa se encontró a 6T para el inóculo CTV (0.29) y los menores valores se registraron a 6T en el inóculo CLas-S (0.02).

Respecto al gen *CDR13*, se encontraron diferencias a 12T (0.05) al inocular con CLas-A contra su testigo (0.17). Al inocular con CLas-S hubo diferencias a 6T (0.03) contra su testigo (0.08). Al inocular con CTV la diferencia se registró a los 12T (0.29) comparado con su testigo (0.09). Los menores valores fueron encontrados a 6T al inocular con CLas-S (0.03) y el valor mayor de cuantificación relativa se registró a 12T al inocular con CTV (0.29).

**Cuadro 2.7.** Análisis de la expresión de genes mediante la cuantificación relativa ( $\Delta Cq$ ) de cinco genes usando dos repeticiones biológicas eliminando el valor atípico en plantas de naranja inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación.

Gen	CLas-A <sup>1</sup>			CLas-S			CTV		
	Testigo <sup>2</sup>	6T	12T	Testigo	6T	12T	Testigo	6T	12T
<i>TIB-NBS-LRR</i>	0.17±0.001	0.16±0.05	0.07±0.02 <sup>3*</sup>	0.06±0.004	0.04±0.01	0.07±0.01	0.09±0.02	0.27±0.22	0.22±0.04**
<i>NB-ARC</i>	0.17±0.02	0.12±0.03	0.09±0.02*	0.05±0.03	0.03±0.002	0.07±0.002	0.10±0.03	0.3±0.26	0.26±0.06**
<i>WRKY70</i>	0.19±0.004	0.12±0.04	0.05±0.02**	0.07±0.01	0.02±0.01*	0.09±0.02	0.11±0.02	0.29±0.24	0.05±0.02**
<i>CDR13</i>	0.17±0.00005	0.13±0.03	0.05±0.02**	0.08±0.01	0.03±0.01**	0.07±0.01	0.09±0.01	0.28±0.24	0.29±0.04**
<i>PP2-B13</i>	0.17±0.07	0.12±0.03	0.04±0.03	0.06±0.03	0.07±0.01	0.2±0.01*	0.15±0.02	0.29±0.20	0.28±0.06*

<sup>1</sup> CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>2</sup> T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>3</sup> Niveles de significancia entre filas aplicados por cada gen y tipo de inóculo \*=-0.10 \*\*=-0.05 \*\*\*=-0.001 \*\*\*\*=-0.0001

Para el gen *PP2-B13*, se encontraron diferencias significativas a 12T al inocular con CTV (0.28) comparado con su testigo (0.15). Los menores valores fueron registrados a 12T al inocular con CLas-A (0.04) y el valor mayor de cuantificación se encontró a 6T al inocular con CTV (0.39).

Los valores  $\Delta Cq$  en este segundo escenario de análisis estadístico muestran significancia de cuatro genes a 12T en plantas inoculadas con CLas-A y en un gene en plantas inoculadas con CLas-S. Los valores  $\Delta Cq$  son otra vez muy bajos pero suficientes para detectar significancias.

**Análisis con sustitución del valor atípico.** En el gen *TIB-NBS-LRR* se encontraron diferencias significativas a 6T (0.16) y 12T (0.07) al inocular con CLas-A comparadas con su testigo (0.17) (Cuadro 2.8). Al inocular con CLas-S también se registraron significancias en 6T (0.02) y en 12T (0.07). Al inocular con CTV se revelaron diferencias significativas a los 6T (0.27) comparado con su testigo CTV Testigo (0.09). Los menores valores de cuantificación se encontraron a 6T al inocular con CLas-S (0.04) y los mayores valores para este gen se registraron también a 6T al inocular con CTV (0.27).

En relación al gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias en la cuantificación relativa a los 6T al inocular con CLas-A (0.12) comparado con su Testigo (0.17). En las plantas inoculadas con CLas-S a los 6T (0.03) se registraron diferencias con su testigo (0.05) y al inocular con CTV se vieron diferencias a 6T (0.3) comparado con su testigo (0.05). Los mayores valores para este gen se registraron a los 6T al inocular con CTV (0.3) y los menores valores de cuantificación se encontraron a 6T al inocular con CLas-S (0.03).

Para *WRKY70* se encontraron diferencias en los tiempos 6T (0.12) y 12 T (0.06) al inocular con CLas-A comparado con su testigo (0.19). La misma tendencia se registró al usar CLas-S como inóculo, 6T (0.02), 12T (0.07) y su Testigo (0.07). En el caso del CTV como fuente de inóculo la diferencia significativa se observó al tiempo T12 (0.04) comparado con su Testigo (0.11). El mayor valor promedio de cuantificación se encontró a 6T al inocular con CTV (0.29) y el menor valor de cuantificación se registró a 6T al inocular con CLas-S (0.02).

**Cuadro 2.8.** Análisis de la expresión de genes mediante la cuantificación relativa ( $\Delta Cq$ ) de cinco genes usando los datos corregidos en plantas de naranja inoculadas con tres inóculos y en diferentes tiempos después de la inoculación.

Gen	CLas-A	CLas-S	CTV
-----	--------	--------	-----

	Testigo	6T	12T	Testigo	6T	12T	Testigo	6T	12T
TIB-NBS-LRR	0.17±0.0015	0.16±0.04***	0.07±0.01**	0.06±0.003	0.04±0.01***	0.07±0.01***	0.09±0.01	0.27±0.16**	0.24±0.006
NB-ARC	0.17±0.01	0.12±0.02***	0.09±0.01	0.05±0.02	0.03±0.002*	0.07±0.002	0.05±0.03	0.3±0.18*	0.29±0.02
WRKY70	0.19±0.003	0.12±0.03*	0.06±0.01***	0.07±0.01	0.02±0.01***	0.07±0.01**	0.11±0.01	0.29±0.17	0.04±0.01***
CDR13	0.17±0.0003	0.13±0.02****	0.06±0.01***	0.08±0.005	0.03±0.01***	0.07±0.01**	0.09±0.01	0.28±0.17***	0.32±0.01****
PP2-B13	0.17±0.05	0.12±0.02***	0.09±0.02***	0.06±0.02	0.07±0.01**	0.2±0.005**	0.15±0.02	0.29±0.14**	0.31±0.01**

<sup>1</sup> CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>2</sup> T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>3</sup> Niveles de significancia entre filas aplicados por cada gen y tipo de inóculo \*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Respecto al gen *CDR13*, se encontraron diferencias significativas a 6T (0.13), 12T (0.06) al emplear CLas-A como inóculo comparado con su Testigo (0.17). Al inocular con CLas-S también hubo diferencias en los dos tiempos 6T (0.03), 12Ts (0.07) contra su Testigo (0.08). En el caso de usar CTV como inóculo las significancias se repitieron a los 6T (0.28) y 12T (0.32). Los menores valores fueron registrados a 6T al inocular con CLas-S (0.03) mientras que los mayores valores de cuantificación se registraron a los 12T al usar CTV como inóculo (0.32).

Para el gen *PP2-B13*, se encontraron diferencias significativas a los 6T (0.12), 12T (0.09) al inocular con CLas-A comparado con su testigo (0.17). En plantas inoculadas con CLas-S hubo diferencia a 6T (0.07), a 12T (0.02) comparada con su testigo (0.06). Al inocular con CTV hubo significancias a 6T (0.29) y 12T (0.31) contra su testigo (0.15). Los menores valores fueron encontrados en el testigo CLas-S (0.06) y el valor mayor de cuantificación se registró a los 12T al inocular con CTV (0.31).

En este tercer escenario de análisis a pesar de los bajos valores obtenidos en la cuantificación relativa es factible detectar diferencias estadísticas. Se registran diferencias significativas en todos los genes a 6T al inocular con cualquiera de los tres inóculos. Al tiempo 12T se registran diferencias en cuatro genes al inocular con cualquiera de los tres inóculos.

### **Comparación de la expresión de los genes entre la fuente de inóculo en el mismo tiempo mediante la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ )**

Para esta comparación se analizaron los datos sólo mediante la expresión normalizada en sus tres escenarios. Ya no se empleó el método de cuantificación relativa ( $\Delta Cq$ ) pues se observó menor resolución en los datos. En el Cuadro 2.9 se presentan los resultados del efecto de los tratamientos es decir diferentes fuentes de inóculo (CLas-A, CLas-S y CTV) comparadas en el mismo tiempo

(6T vs 6T y 12T vs 12T) analizadas por gen mediante el método  $\Delta\Delta Cq$ , las significancias producto de la comparación de prueba de T de la expresión normalizada fueron obtenidas del promedio de tres repeticiones biológicas.

En el caso de la expresión del gen *TIB-NBS-LRR* se encontraron diferencias significativas al inocular con CLas-S, al tiempo 6T se registró una expresión normalizada de 0.43 comparado una expresión de 1.37 al usar CLas-A como inóculo en el mismo tiempo. Al inocular con CTV la expresión fue mayor (2.06) que con cualquiera de los inóculos de CLas.

En relación al gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias estadísticas. El efecto del inóculo en este gen a 6T fue importante pues mientras al usar CLas-A se registró un valor de 0.52 para la presencia de CLas-S su valor fue de menos de la mitad (0.22). Podríamos decir que este gene está teniendo un efecto en la condición asintomática de la planta inculada con CLas-A. Para el caso de CTV una vez más presenta los valores más altos de expresión entre inóculos a los 6T. Al tiempo 12T las diferencias en la expresión de este gen entre los inóculos CLas-A y CLas-S disminuyen sin embargo se mantiene la tendencia de mayor expresión en CLas-A.

La expresión del gen relacionado con el factor de transcripción (FT) *WRKY70* registra diferencias significativas al inocular con CLas-S 6T (0.31) contra el empleo de CLas-A como inóculo a 6T (0.88), también se encontraron diferencias significativas en el inóculo CTV 12T (0.85) contra el inóculo CLas-A 12T (0.66). Las diferencias de los valores de expresión entre los tres inóculos son acentuadas a los seis meses mientras que a los doce meses estas diferencias son menos evidentes e incluso desaparecen entre los inóculos de CLas. Este gen junto con el *TIB-NBS-LRR* son los que mayores valores de expresión registran de los cinco genes evaluados. Para el caso de las plantas infectadas con CTV una vez más se registran los mayores valores de expresión entre los tres inóculos.

En la expresión normalizada del gen *CDR13* no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tres inóculos al tiempo 6T, CLas-S (0.31), CLas-A (0.4) y CTV (1.8). A los 12T no hubo diferencias al emplear CLas-A (0.24) ni CLas-S (0.33) como inóculo pero sí la hubo al inocular con CTV. El gene *CDR13* se expresó diferencialmente en los inóculos. La presencia del inóculo CTV indujo los valores de expresión más altos de los tres inóculos en ambos tiempos, fue de 3.17 a los seis meses y de 0.41 a los 12 meses.

**Cuadro 2.9.** Comparación de la expresión de cinco genes entre tres inóculos en el mismo tiempo mediante el análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ )

Gen	6T <sup>1</sup>			12T		
	CLas-A <sup>2</sup>	CLas-S	CTV	CLas-A	CLas-S	CTV
<i>TIB-NBS-LRR</i>	1.37±0.11 <sup>3</sup> a	0.43±0.11b	2.06±1.67a	0.84±0.18a	0.94±0.12a	1.08±0.02a
<i>NB-ARC</i>	0.52±0.02a	0.22±0.05b	1.88±1.46a	0.49±0.05a	0.38±0.05b	0.46±0.03a
<i>WRKY70</i>	0.88±0.04a	0.31±0.10b	1.35±1.12a	0.66±0.09a	0.66±0.11 <sup>a</sup>	0.85±0.05b
<i>CDR13</i>	0.4±0.02a	0.3±0.14a	3.17±2.46a	0.24±0.02a	0.33±0.08a	0.41±0.03b
<i>PP2-B13</i>	0.44±0.001a	0.22±0.01b	1.12±1.07a	0.22±0.04a	0.39±0.09a	0.28±0.02b

<sup>1</sup>T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>2</sup>CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>3</sup> Valores con la misma letra no hay diferencia entre inóculos al mismo tiempo

En el gen PP2-B13, se encontraron diferencias significativas entre inóculos pues al emplear CLas-S se registró una expresión de 0.22 mientras que al emplear CLas-A 6T se observó una expresión de 0.44 al tiempo 6T. A este tiempo la expresión normalizada de este gene es el doble en el inóculo CLas-A que en el inóculo CLas-S. En el tiempo 12T también se encontraron diferencias al inocular con CTV (0.28) que al inocular con cualquiera de las cepas de CLas. Al tiempo 12T la expresión en los dos inóculos de CLas cambia, mientras que en presencia de CLas-A disminuye el valor de expresión normalizada sucede lo contrario en presencia de CLas-S. No obstante la condición asintomática de las plantas se mantiene.

Es importante resaltar que todos los genes tuvieron una expresión normalizada mayor en el tiempo 6T en presencia del inóculo CLas-A comparado con la presencia del inóculo CLas-S. Al tiempo 12T la diferencia entre los valores de expresión se reduce en los tres inóculos. También se observó que al tiempo 6T las plantas inoculadas con CLas-A registraron el mayor valor de la expresión de *TIB-NBS-LRR*, seguida por la expresión de *WRKY70* mientras que los genes *PP2-B13*, *NB-ARC* y *CDR13* mostraron valores de expresión menores. Las plantas inoculadas con CTV vuelven a presentar los mayores valores de expresión que las inoculadas con cualquiera de los dos inóculos de CLas. Podemos decir que bajo las presentes condiciones experimentales la expresión diferencial de los genes que induce CLas-A está contribuyendo a la condición asintomática de las plantas de naranjo inoculadas, induciendo la sobreexpresión de todos los genes. La diferencia entre plantas inoculadas con CLas-A y plantas inoculadas con CLas-S a 6T es la sobreexpresión de los

cinco genes en el primero y la reducción en la expresión en el segundo. Estadísticamente hay diferencias pero resulta difícil asociar la condición asintomática o bien la condición sintomática a algún gene más que a otro. A los 12T los valores disminuyen al inocular con CLas-A y se mantienen al inocular con CLas-S.

La expresión de los genes a 6T es diferente al inocular con CLas-A comparado con los valores obtenidos al inocular con CLas-S, son mayores en el primer caso. Podemos decir que al inocular las plantas con CLas-A, todos los genes son inducidos a sobreexpresarse al tiempo 6T para mantener su condición asintomática mientras que al inocular con CLas-S todos los genes mantienen sus valores de expresión más bajo. Los mayores valores de expresión se presentan en los genes *TIB-NBS-LRR* y *WRKY70* en los dos inóculos de CLas.

En el Cuadro 2.10 se presentan los resultados de la expresión diferencial de los genes al eliminar la repetición atípica mediante  $\Delta\Delta Cq$  comparando los tratamientos en el mismo tiempo. En los genes *TIB-NBS-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY7* y *PP2-B13* se encontraron diferencias significativas en las plantas inoculadas con CLas-S contra las inoculadas con CLas-A al tiempo 6T. Respecto a la expresión de *CDR13*, no mostró diferencias entre inóculos y fue estadísticamente igual en plantas inoculadas con cualquiera de las cepas de CLas. Las plantas inoculadas con CTV mostraron los mayores valores de expresión en todos los genes al tiempo 6T. El efecto del inóculo es menor al tiempo 12T en cuatro de los cinco genes analizados. Al inocular con CTV se registraron diferencias significativas en 12T (0.41) contra CLas-A (0.24).

El efecto del inóculo CTV a los seis meses es importante en la expresión de *PP2-B13* pues sus valores son de cuatro a nueve veces más comparado con los otros dos inóculos mientras que a los seis meses disminuye drásticamente de 1.12 a 0.28 respectivamente.

**Cuadro 2.10.** Comparación de la expresión de cinco genes entre tres inóculos en el mismo tiempo mediante el análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) eliminado el valor atípico.

Gen	6T <sup>1</sup>			12T		
	CLas-A <sup>2</sup>	CLas-S	CTV	CLas-A	CLas-S	CTV
<i>TIB-NBS-LRR</i>	1.37±0.11 <sup>3</sup> a	0.43±0.11b	2.06±1.67a	0.84±0.18a	0.94±0.12a	1.08±0.02a
<i>NB-ARC</i>	0.52±0.02a	0.22±0.05b	1.88±1.46a	0.49±0.05a	0.38±0.05b	0.46±0.03a
<i>WRKY70</i>	0.88±0.04a	0.31±0.10b	1.35±1.12a	0.66±0.09a	0.66±0.11a	0.85±0.05b
<i>CDR13</i>	0.4±0.02a	0.3±0.14a	3.17±2.46a	0.24±0.02a	0.33±0.08a	0.41±0.03b

<i>PP2-B13</i>	0.44±0.001a	0.22±0.01b	1.12±1.07a	0.22±0.04a	0.39±0.09a	0.28±0.02b
----------------	-------------	------------	------------	------------	------------	------------

<sup>1</sup>T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>2</sup>CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>3</sup> Valores con la misma letra no hay diferencia entre inóculos al mismo tiempo

En el Cuadro 2.11 se muestra la comparación entre tratamientos en el mismo tiempo mediante  $\Delta\Delta Cq$  ajustando los valores de una de las repeticiones. Para el gen *TIB-NBS-LRR* se encontraron diferencias significativas al inocular con CLas-S 6T (0.43) contra el uso de CLas-A 6T (1.37). En relación al gen *NB-ARC*, se encontraron diferencias al inocular con CLas-S 6T (0.22) y CTV 6T (1.04) contra CLas-A 6T (0.52). En el tiempo 12T también hubo diferencias entre inocular con CLas-S (0.38) e inocular con CLas-A (0.49). En el factor de transcripción (FT) *WRKY70* se encontraron diferencias significativas al usar CLas-S como inóculo (0.31), CTV como inóculo (0.71) y también al inocular con CLas-A (0.88) al tiempo 6T. Respecto a la expresión de *CDR13*, se encontraron diferencias significativas en el inóculo CTV 6T (1.75) contra CLas-A 6T (0.4), y para el inóculo CTV 12T (0.41) contra CLas-A 12T (0.24). En el gen *PP2-B13*, se encontraron diferencias significativas en CLas-S 6T (0.22) contra CLas-A 6T (0.44) y también para CTV 12T (0.28) contra CLas-A 12T (0.22).

**Cuadro 2.11.** Comparación de la expresión de cinco genes entre tres inóculos en el mismo tiempo mediante el análisis de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) usando un valor corregido.

Gen	6T <sup>1</sup>			12T		
	CLas-A <sup>2</sup>	CLas-S	CTV	CLas-A	CLas-S	CTV
<i>TIB-NBS-LRR</i>	1.37±0.11a <sup>3</sup>	0.43±0.11b	1.10±0.13 <sup>a</sup>	0.84±0.18a	0.94±0.12a	1.08±0.02 <sup>a</sup>
<i>NB-ARC</i>	0.52±0.02a	0.22±0.05b	1.04±0.04c	0.49±0.05a	0.38±0.05b	0.46±0.03 <sup>a</sup>
<i>WRKY70</i>	0.88±0.04a	0.31±0.10b	0.71±0.05c	0.66±0.09a	0.66±0.11a	0.85±0.05b
<i>CDR13</i>	0.4±0.02a	0.3±0.14a	1.75±0.18c	0.24±0.02a	0.33±0.08a	0.41±0.03b
<i>PP2-B13</i>	0.44±0.001a	0.22±0.01b	0.50±0.06 <sup>a</sup>	0.22±0.04a	0.39±0.09a	0.28±0.02b

<sup>1</sup>T= testigo al tiempo cero; 6T= 6 meses después de la inoculación; 12T= 12 meses después de la inoculación

<sup>2</sup>CLas-A= inóculo asintomático de *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CLas-S= inóculo sintomático de CLas; CTV= *Citrus Tristeza Virus*

<sup>3</sup> Valores con la misma letra no hay diferencia entre inóculos al mismo tiempo

Bajo este escenario de análisis de datos el gen *TIB-NBS-LRR* registra los mayores valores de expresión en CLas-A. La mayoría de los genes son estadísticamente diferentes al inocular con CLas-A comparado con inocular con CLas-S. Estos resultados impiden atribuirle a algún gen más

que a otro la asintomatología que induce la cepa CLas-A ni la sintomatología que induce la cepa CLas-S.

## 2.6 DISCUSIÓN

### Método de análisis

Los estudios de expresión diferencial génica requieren múltiples procesos dependientes y la validación de cada uno de ellos. Factores externos como son la diversidad de reactivos, equipos, o precisión del técnico al ejecutar el procedimiento deben de ser considerados en la planeación para su influencia en la generación de información y considerando que los cálculos son complejos porque los datos de qPCR son relativos por naturaleza, entre muestras o grupos de muestras, una forma de minimizar esta variación es con la normalización con genes de referencia y calibración entre placas. Es importante considerar esta estrategia de cuantificación ya que es conveniente para investigar los cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica. (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002; Bustin *et al.*, 2005; Vandesompele *et al.*, 2019). La variabilidad biológica, se asocia a el error aleatorio en el experimento de qPCR, por lo que se debe realizar una selección aleatoria y el número de muestras por grupo biológico mínimo de 3, para garantizar resultados estadísticamente significativos y reproducibles que brinden la precisión y exactitud para la publicación (Taylor *et al.*, 2019).

### Expresión ( $\Delta\Delta Cq$ ) de los genes en el tiempo

Las proteínas *NBS-LRR* de plantas detectan proteínas asociadas a patógenos, a menudo las moléculas efectoras de los patógenos responsables de la virulencia. Muchas proteínas de virulencia son detectadas indirectamente por las proteínas vegetales *NBS-LRR* a partir de modificaciones que las proteínas de virulencia en las proteínas diana del huésped (DeYoung y Innes, 2006). La interacción entre planta y patógeno descansa en el sistema inmune innato de la planta. Este sistema puede reconocer patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP por sus siglas en inglés) y está mediado por patrones de reconocimiento de receptores (PRR) localizados en la superficie de las membranas del hospedero. El reconocimiento de PAMP activa la inmunidad desencadenada por PAMP (PTI por sus siglas en inglés) y se manifiesta como una cascada de genes transcritos en respuesta al ataque (da Graça *et al.*, 2016). Al respecto la mayor detección de *TIB-NBS-LRR* en el inóculo CLas-A mostró un aumento desde el inicio del estudio, a los 6T, sin embargo, al 12T hubo una disminución de la expresión del gen. El inóculo CTV mostró la misma tendencia, cuando hay

un reconocimiento exitoso de patógenos, estos producen efectores que inhiben la PTI, los cuales son reconocidos por las plantas mediante receptores adicionales, entre ellas proteínas *NB-LRR* (nucleotidebinding leucine-rich repeat), las cuales desencadenan respuestas efectoras, es decir la segunda forma de actuación de la inmunidad innata y se denomina ETI (effector-triggered immunity) (Jones y Dangl, 2006) Xu *et al.* (2018) clonaron y caracterizaron un gen NBS-LRR *ZmNBS25* en maíz y mostró que, en comparación con las plantas de control, *ZmNBS25* sobreexpresión (*ZmNBS25-OE*) en *Arabidopsis* y arroz dio como resultado mayores niveles de SA. Los resultados sugieren que *ZmNBS25* puede funcionar como un gen de resistencia a enfermedades (Xu *et al.*, 2008).

Tanto para el gen *TIB-NBC-LRR* Y *NB-ARC* para el inóculo *CLas-S* la mayor expresión se detectó al 12T. Las proteínas de resistencia (R) en las plantas confieren especificidad al sistema inmune innato. La mayoría de las proteínas R tienen un dominio *NB-ARC* (Tameling *et al.*, 2006). La especificidad del sistema inmune innato de la planta a menudo se confiere por las proteínas de resistencia (R). La mayoría de las proteínas R contienen repeticiones ricas en leucina (LRR), un sitio central de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio amino terminal variable. Los LRR están involucrados principalmente en el reconocimiento, mientras que el dominio amino-terminal determina la especificidad de señalización (Jones y Dangl, 2006).

La expresión de *WRKY70* en tiempo para el inóculo *CLas-A* presentó un aumento desde el inicio del estudio, a los 6T, sin embargo, al 12 T hubo una disminución de la expresión del gen, en relación al inóculo *CTV* mostró la misma tendencia, *CLas-S* la expresión fue al contrario presento una disminución a los 6T y posteriormente se recuperó a los 12T. En plantas transgénicas alteradas en la expresión de *WRKY70*, así como a los mutantes knockout *WRKY70* de *Arabidopsis*, con los patógenos fúngicos *Alternaria brassicicola* y *Erysiphe cichoracearum*, mostraron que *WRKY70* tiene un papel fundamental en la determinación del equilibrio entre las rutas de defensa dependientes de SA y JA (Li *et al.*, 2006). Para establecer infecciones exitosas, los patógenos bacterianos, oomicetos, fúngicos y virales de las plantas han desarrollado al menos tres estrategias principales para interrumpir la defensa mediada por SA. Reducir la acumulación de SA, la amplia gama de estrategias implementadas por los patógenos de las plantas destaca el papel crucial de la interrupción de la defensa de las plantas mediada por SA en la patogenia de las plantas directamente mediante la conversión de SA en sus derivados inactivos. La segunda estrategia es

interrumpir la biosíntesis de SA dirigiéndose a la ruta ICS1. En la tercera estrategia principal, los patógenos de las plantas despliegan diferentes mecanismos para interferir con la señalización aguas abajo de SA (Qi *et al.*, 2018).

La sobreexpresión de *CDR1* en *Arabidopsis* causa enanismo y resistencia a la virulenta *Pseudomonas syringae*, los fenotipos reflejaron la activación dependiente del ácido salicílico de explosiones microoxidativas y varios genes relacionados con la defensa. La expresión de *CDR13* en los inóculos CLas-A y CTV en relación al tiempo presentaron la tendencia de aumento desde el inicio del estudio, a los 6T, sin embargo al 12T hubo una disminución de la expresión del gen, en relación al inóculo CTV mostro la misma tendencia pero la disminución en 12T fue a drásticamente marcada, CLas-S la expresión fue al contrario presento una disminución a los 6T y posteriormente se recuperó a los 12T, Yu *et al.* (2017) obtuvieron la mayor expresión de genes en la semana siete, mismos que posiblemente podrían jugar un papel importante contra CLas aunque estos genes no fueron necesariamente inducidos por CLas, Rawat *et al.* (2017), Fu *et al.* (2016) asocian la tolerancia de híbridos a HLB a la sobre expresión de CDR. La sobreexpresión del gen *CDR* lleva a la regulación positiva de dos genes relacionados con la patogénesis *PR1* y *PR2* (Rawat *et al.*, 2017, Ying *et al.*, 2020).

En relación de la expresión de *PP2-B13* en CLas-A y CTV en relación al tiempo presentaron la tendencia de aumento desde el inicio del estudio, a los 6T, sin embargo al 12T hubo una disminución de la expresión del gen, en relación al inóculo CTV mostro la misma tendencia, CLas-S la expresión fue al contrario presento una disminución a los 6T y posteriormente se recuperó a los 12T. Las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. Tres tipos principales de estas estructuras se han observado en las enfermedades de las plantas: a) La capa externa de la pared celular de las células parenquimatosas que entra en contacto con grupos de bacterias incompatibles se hincha, y este hinchamiento va acompañado de la producción de material fibrilar amorfo que rodea y atrapa a las bacterias y evita que se multipliquen; b) engrosamiento de las paredes celulares, c) depósitos de calosa, papilas, en la superficie interna de las paredes celulares en respuesta a la invasión por patógenos (Agrios, 2011). Los primeros

síntomas de HLB en las hojas en naranjo dulce especialmente, son el síntoma de manchas asimétricas y difusas en hojas, las hojas pueden ser pequeñas y estar erguidas con una variedad de patrones cloróticos que a menudo se parece a deficiencias minerales como las de zinc, hierro y manganeso (University of Florida, 2003). En este sentido, Mafra *et al.* (2013), en genotipos de los cítricos susceptibles, encontró que el bloqueo de los elementos cribosos del floema también afecta la translocación de nutrientes importantes a través de la planta, inhibiendo el transporte del floema, contribuyendo al desarrollo de síntomas de HLB (Koh *et al.*, 2012). Se sugiere que la expresión de *PP2-B13* está relacionado con la obstrucción del floema mismo que pueden desempeñar un papel en el inicio de los síntomas de la enfermedad en variedades susceptibles (Wang *et al.*, 2016) en relación a esto Fu *et al.*, 2017 menciona que la expresión del gen *PP2-B13* se redujeron en presencia de CTV esto en estudios del transcriptoma a los 6 meses después de la inoculación, lo que podría sugerir que la proteína es activada al inicio de la infección y en presencia de CLas se sobreexpresa coincidiendo con los resultados obtenidos para el en cuanto a la detección de CLas en cítricos Infección de cítricos con CLas no condujo a una inducción considerable de genes relacionados con la defensa 5-9 semanas después de la inoculación, aunque algunos genes fueron inducidos menos de tres veces (Albrecht y Bowman 2009). Matos *et al.* (2013) en una caracterización de poblaciones de CLas y se ubicaron dos haplotipos en las muestras analizadas en México. Alanís-Martínez y compañía en 2013 determinaron la diversidad genética de CLas en la citricultura mexicana, e indican mayor diversidad genética podría estar relacionada con el origen geográfico del patógeno, las rutas de introducción-dispersión y/o mutaciones inducidas por el ambiente y la interacción con cítricos ácidos.

### **Expresión ( $\Delta\Delta Cq$ ) de los genes entre inóculos**

En relación a la diferencia de expresión de los inóculos de CLas-A y CLas-S podría relacionarse a una mayor actividad del complejo *R-Avr* debido a que, los genes *NBS-LRR* de las plantas interactúan con las proteínas efectoras del patógeno para activar las vías de transducción de señales involucradas en la inmunidad innata, mientras que los dominios TIR y CC reconocen específicamente los complejos *R-Avr* e inician la señalización de defensa aguas abajo (Liu *et al.*, 2007). En el estudio de las codificaciones de transcripciones ricas en leucina (LRR) fueron reguladas tanto para CTV como para CLas (Fu *et al.*, 2016).

Las proteínas *NBS-LRR* codificadas por la mayoría de los genes *R* representan importantes receptores intracelulares que reconocen directa o indirectamente las proteínas efectoras del patógeno, que posteriormente activan las respuestas de defensa de la planta el gen *TIR-NBS-LRR* inducido por *Plasmopara viticola*, llamado *VaRGA1*, de tejidos foliares de vid "Shuanghong" de *Vitis amurensis* altamente resistente al moho. El gen *TIR-NBS-LRR VaRGA1* en el tabaco mejoró la resistencia a *Phytophthora parasítica* (Li *et al.*, 2016).

La diferencia de expresión de los inóculos en ambos tiempos la menor fue para CLas-S, lo que hace suponer que la presencia de este inóculo altera la detección de las proteínas del tipo *NB-ARC* ya que estas se asocian receptores inmunes modulares que desencadenan la muerte celular rápida en respuesta al intento de infección por patógenos el dominio *NB-ARC* se cree que actúa como un interruptor molecular, un ciclo entre ADP (reprimido) y ATP (activo) (Steele *et al.*, 2019). La unión del inductor al dominio sensor activa la proteína al promover el ADP para el intercambio de ATP, probablemente mediante la eliminación de una interacción inhibidora intramolecular, mientras que la hidrólisis de ATP apaga la proteína (Danot *et al.*, 2009).

Takken y Goverse en el 2012 indican que el modelo en el que el dominio CC interactúa simultáneamente con los dominios *NB-ARC* y *LRR* dando como resultado una estructura compacta una proteína *NB-LRR* competente en señalización requiere un pliegue complejo que se estabiliza mediante interacciones dominio-dominio, en este estado, los patógenos invasores pueden inclinar fácilmente el equilibrio, pero en su ausencia la proteína permanece "off". El *NBS* forma parte de un dominio de unión a nucleótidos (*NB*) -*ARC* que presumiblemente funciona como un interruptor molecular, lo que surge un modelo funcional en el que los *LRR* controlan el estado molecular del dominio *NB-ARC* (Meyer *et al.*, 1999, Takken *et al.*, 2006).

El Factor de transcripción *WRKY70* para el inóculo CLas-S fue el de menor expresión en 6T, destacando que la activación e inactivación de los receptores de reconocimiento de patrones (PTI) activa la resistencia adquirida sistémica (*SAR*) que es un mecanismo inmune inducido en las plantas es de amplio espectro, sin especificidad para la infección inicial. Un patógeno avirulento que causa la muerte celular programada local puede inducir *SAR* a través de la generación de señales móviles, la activación de *SAR* promueve la acumulación del ácido salicílico que activa la secreción de las proteínas antimicrobianas *PR* (relacionadas con la patogénesis), la relación del coactivador de *NPRI* (no expresión del gen 1 relacionado con la patogénesis) como regulador

maestro de SAR la forma en que interactúa con los factores de transcripción en los que se incluyen los *WRKY* para activar la expresión del gen de defensa aún no se comprende bien cuál es su función pero aun así se sabe cumplen papeles críticos en la activación de la SAR (Fu y Dong, 2013, Qi *et al.*, 2018). La mayor expresión de *WRKY70* a los seis meses en las plantas inoculadas con CLas-A se deba a la activación de los genes de resistencia previo a la activación de SAR más eficiente que CLas-S.

Para el *CDR13* en relación de inóculo de CLas-A y CLas-S la expresión similar, sin embargo, CTV mostro una expresión alta. En el genoma de *Arabidopsis* fueron identificados 50 genes que codifican para proteínas aspárticas (AP) del tipo pepsina (A1), con tres categorías o grupos diferentes: típicas, tipo nucelina, y atípicas, *CDR1* es un enzima apoplástica "atípicas" las funciones para los AP atípicos, con roles propuestos en las respuestas al estrés biótico y abiótico, el metabolismo de los cloroplastos y el desarrollo reproductivo (Simões *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2019). La capacidad de los patógenos para causar enfermedades en los hospedadores de sus plantas depende de la producción de factores de virulencia. En varios casos, se han identificado proteasas aspárticas como el factor responsable de la invasión y estas enzimas a menudo están íntimamente involucradas en la relación huésped-parásito. Se ha documentado el papel de las proteasas aspárticas en la infección de plantas por hongos como *Cryphonectria parasitica* que segrega al menos tres proteasas aspárticas distintas. La actividad proteolítica de las secreciones de este hongo que permite al parásito establecerse en un ambiente rico en nutrientes. *Botrytis cinerea* también secreta al menos una proteína aspártica<sup>4</sup> que se cree que juega un papel clave en Patogénesis (Hill y Phylip 1998, Xia *et al.*, 2004,). *CDR1* se acumula en el líquido intercelular en respuesta a los ataques de patógenos, en la que se cree que *CDR1* media un sistema de señal peptídica implicado en la activación de mecanismos de resistencia inducibles (Xia *et al.*, 2004; Rawat *et al.*, 2017).

El gen *PP2-B13*, la expresión para CLas-S en el tiempo 6T fue baja con respecto a CLas-A en el mismo tiempo, para el inóculo de CTV en el tiempo 12 fue baja. La deposición de callosa fue el principal mecanismo de taponamiento en la descarga infectada con HLB, donde redujo el espacio abierto de los poros. La expresión de los genes *CALLOSE SYNTHASE7* y *PHLOEM PROTEIN 2* estaba regulados al alza en los brotes, pero a la baja en los tejidos de la raíz. En las capas de semillas, no se observó oclusión del floema y se acumuló CLas a niveles altos (Achor *et al.*, 2020). El sistema vascular de la planta juega un papel fundamental en el suministro de

nutrientes a los órganos ubicados a distancia. Los descubrimientos recientes han proporcionado una nueva visión de un papel novedoso para los plasmodesmos y el floema en términos del transporte y la entrega de macromoléculas de información (es decir, proteínas y complejos de ribonucleoproteínas). El control no celular/órgano autónomo sobre la expresión génica puede funcionar tanto en la señalización de defensa como en la programación del desarrollo en plantas (Ruiz-Medrano *et al.*, 2001). Las células de floema de cítricos infectadas con HLB sufren modificaciones estructurales que incluyen engrosamiento de la pared celular, inducción de proteínas de callosa y taponamiento celular (Achor *et al.*, 2020). La proteína 2 del floema (PP2) es una de las proteínas más abundantes y enigmáticas de la savia del floema. Aunque se cree que está asociado con la proteína P estructural, PP2 se transloca en la corriente de asimilación, donde su actividad de lectina o sus propiedades de unión al ARN pueden ejercer efectos a largas distancias. Dentro de esta superfamilia, las proteínas PP2-B tienen un polimorfismo de tamaño considerable. Esto es atribuible a la variabilidad en la longitud del término amino que se extiende desde un dominio altamente conservado. El dominio PP2 conservado se identificó en las proteínas codificadas por seis genes de varias cucurbitáceas, apio (*Apium graveolens*) y *Arabidopsis* que se expresan específicamente en el complejo de células del elemento criboso (Dinant *et al.*, 2003).

## 2.7 CONCLUSIONES

En este estudio de expresión empleando primers específicos, a cinco genes seleccionados por su asociación con respuestas de resistencia inducida a la infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y/o *Citrus tristeza virus* (CTV) en cítricos dulces, mostró viabilidad para evidenciar expresión diferencial de genes dependiendo del tipo de infección sintomática (CLas-S), o asintomática (CLas-A) de CLas y de una cepa moderada T30 de CTV en *Citrus sinensis/Citrus aurantium*, todas con incidencia en la región citrícola del centro Golfo de México con infecciones simples o mixtas.

En condiciones de invernadero, el monitoreo con qPCR de la infección bacteriana y del virus en paralelo con la expresión diferencial de los genes: *TIB-NBS-LRR*, *NB-ARC*, *PP2-B13*, *WRKY70* y *CDR13* revelaron que los genes se expresan diferencialmente en el tiempo en respuesta a CLas-A, CLas-S y CTV en condiciones de invernadero. La detección del patógeno en el tejido foliar fue a los 3.5 MDI para el inóculo CTV, para CLas-S a 4.5 MDI y CLas-S a 6 MDI.

Por lo anterior y considerando las diferentes funciones que realiza un gen, se infiere, partiendo de la alta relación encontrada, que los mecanismos de defensa vs la concentración de CLas-A y CTV disparan la acción de los diferentes genes de manera similar.

El gen que codifica proteínas ricas en leucina (*TIB-NBS-LRR*) en CLas-A se expresan a los 6 meses ( $p=0.01$ ) y para CLas-S ( $p=0.06$ ) hasta los 12 meses después de la infección, coincidiendo con la expresión de *NB-ARC* ( $p=0.02$ ) la cual depende de la expresión de *TIB-NBS-LRR*. Esto indica que los mecanismos de activación dependen de múltiples mecanismos fisiológicos y parasíticos correlacionados. Estos genes se expresaron más temprano en la infección con CLas-A lo que posiblemente explica la reacción asintomática en la planta.

El factor de transcripción *WRKY70* tuvo la mayor regulación en CLas-A ( $p=0.01$ ) y menor en CLas-S ( $p=0.11$ ). La mayor regulación de *CDR13*, putativamente relacionada a la resistencia a enfermedades constitutivas, fue para CTV ( $p=0.06$ ). La regulación de *PP2-B13* relacionado con la proteína del floema la menor regulación fue para CLas-S ( $p=0.28$ ) y la mayor fue para CTV ( $p=0.10$ ). En relación a la regulación de los genes *TIB-NB-LRR* y *NB-ARC* relacionadas con las proteínas receptoras, la respuesta a la activación de la pared celular como primera activación de defensa de plantas es compleja y depende de la manifestación en cascada de varios mecanismos en conjunto.

Tomando como base este estudio podemos concluir que la respuesta de regulación fue contrastante entre patógenos con expresión diferencial de genes en CLas-A, CLas-S y CTV. La condición asintomática podría estar relacionada con los genes *TIB-NB-LRR* y *WRKY70* los cuales son dependientes de la concentración bacteriana. En CTV, la coincidencia de mayor regulación para los genes *TIB-NB-LRR*, *NB-ARC*, *WRKY70* y *CDR13*, podría estar relacionada con la temprana detección del patógeno en la planta sugiriendo una rápida activación de estos genes y con mayor expresión. Esto podría explicar el comportamiento asintomático de esta cepa moderada tipo T30, esta es una cepa prevalente en México por lo que los mecanismos de la planta pueden ser más estables.

Los resultados muestran que las plantas inoculadas con CLas-A elevan sus valores de expresión al T6 en los cinco genes mientras que al tiempo T12 los valores bajan en todos los genes también. En las plantas inoculadas con CLas-S los valores de expresión al T6 se conservan muy

parecidos a los valores de su Testigo (T). Al tiempo 12T suben en dos genes (*TIB-NBS-LRR* y *NB-ARC*) y se conservan en los demás genes.

Este segundo escenario de análisis estadístico muestra ligeros cambios en los valores de la expresión normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) de los genes comparados con el escenario anterior, sin embargo arroja diferencias estadísticas al tiempo 6T en tres genes (*TIB-NBS-LRR*, *WRKY70* y *PP2-B13*) en plantas inoculadas con CLas-A y en dos genes (*WRKY70* y *PP2-B13*) en plantas inoculadas con CLas-S.

Los resultados de expresión de expresión normalizada en este tercer escenario muestran diferencias significativas en los cinco genes al inocular con CLas-A en los tiempos 6T y 12T. En cuatro genes al inocular con CLas-S en los tiempos 6T y 2T. También en cuatro de cinco genes al inocular con CTV en los dos períodos de tiempo.

El método de cuantificación relativa utilizando tres muestras biológicas, muestra en general valores de expresión más bajos que el método de expresión normalizada.

Los valores  $\Delta Cq$  en este segundo escenario de análisis estadístico muestran significancia de cuatro genes a 12T en plantas inoculadas con CLas-A y en un gene en plantas inoculadas con CLas-S. Los valores  $\Delta Cq$  son otra vez muy bajos pero suficientes para detectar significancias.

En este tercer escenario de análisis a pesar de los bajos valores obtenidos en la cuantificación relativa es factible detectar diferencias estadísticas. Se registran diferencias significativas en todos los genes a 6T al inocular con cualquiera de los tres inóculos. Al tiempo 12T se registran diferencias en cuatro genes al inocular con cualquiera de los tres inóculos. Bajo este escenario de análisis de datos el gen *TIB-NBS-LRR* registra los mayores valores de expresión en CLas-A. La mayoría de los genes son estadísticamente diferentes al inocular con CLas-A comparado con inocular con CLas-S. Estos resultados impiden atribuirle a algún gen más que a otro la asintomatología que induce la cepa CLas-A ni la sintomatología que induce la cepa CLas-S.

Para el análisis de cambio genético en este experimento como el método adecuado fue el de la expresión normalizada, con las tres repeticiones biológicas originales.

## 2.8 LITERATURA CITADA

- Achor D, Welker S, Ben-Mahmoud SK, Wang Ch, 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. DOI: 10.1104/pp.19.01391
- Albrecht U and Bowman KD. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science* 175: 291–306. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.001>
- Ameline-Torregrosa C, Wang BB, O’Bleness MS, Deshpande S, Zhu H, Roe B, Young ND and Cannon SB. 2008. Identification and characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 146: 5-2. doi: 10.1104/pp.107.104588
- Bar-Joseph M, Marcus R and Lee RF. 2003. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Volume publication date September 1989, *Annual Review of Phytopathology* 27:291-316. DOI:10.1146/annurev.py.27.090189.00145
- Bassanezi RB, Montesino LH, Godoy GMC, Filho AB and Amorin L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130:577-586. DOI 10.1007/s10658-011-9779-1
- Bio-Rad. 2013. Bulletin Biorad10021337. Bio-Rad Laboratories 147. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10021337.pdf>
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G and Zhao H. 2016. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 58(4):373-387. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>
- Dangl JL and Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Danot O, Marquenet E, Vidal-Ingigliardi D and Richet E. 2009. Wheel of life, wheel of death: a mechanistic insight into signaling by STAND proteins. *Structure* 17: 172-182. doi: 10.1016/j.str.2009.01.001
- 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. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120012
- DeYoung BJ and Innes RW. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* 7(12):1243-1249. DOI: 10.1038/ni1410

- Dinant S, Clark AM, Zhu Y, Vilaine F, Palauqui J-Ch, Kusiak Ch and Thompson GA. 2003. Diversity of the superfamily of phloem lectins (Phloem Protein 2) in angiosperms. *Plant Physiology* 131: (1) 114-128. DOI: 10.1104/pp.013086
- Dong J, Chen C and Chen Z. 2003. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51: 21–37. doi:10.1023/a:1020780022549
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15. [https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Esquivel ChF. 2016. Dinámica de la concentración bacteriana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y su efecto en la expresión sintomática e histológica en cítricos agrios y dulces e implicaciones en el potencial de inóculo. Disertación para obtener el grado de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Estado de México. 145 p.
- Fu S, Shao J, Paul C, Zhou Ch and Hartung JS. 2017. Transcriptional analysis of sweet orange trees co-infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus* and mild or severe strains of *Citrus Tristeza Virus*. *BMC Genomics* 18:837. DOI: 10.1186/s12864-017-4174-8
- Fu S, Shao J, Paul C, Zhou Ch and Hartung JS. 2017. Transcriptional analysis of sweet orange trees co-infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus* and mild or severe strains of *Citrus tristeza virus*. *BMC Genomics* 18:837. DOI: 10.1186/s12864-017-4174-8
- Fu S, Shao J, Zhou Ch and JS. Hartung 2016. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus* and two strains of *Citrus Tristeza Virus*. *BMC Genomics* 349(17): 1-18. DOI: 10.1186/s12864-016-2663-9
- Fu Z, Dong Q and Dong X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64:839–63. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105606
- Gal-On A and Shibolet Y. 2006. Cross protection. In: Loebenstein G. and Carr, J.P., Eds., *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Springer, Dordrecht 261-288. [http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3780-5\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3780-5_12)
- Hafiz EB, Njoroge RK, Zhang Z and Xu P. 2019. Transcription factor associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes* 10(771):1-23. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>
- Halberth SE and Manjunath K.L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: psyllidae: psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 330-353. DOI.org/101653/0015-4040(2004)087[0330:ACPSPA]2.0.CO;2

- Hernández N. G. 2013. Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición de *Citrus Tristeza Virus* en la península de Yucatán. Disertación para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 73 p.
- Hill J and Phylip L H. 1998. Aspartic proteinases and inhibitors in plant pathogenesis. In: James M.N.G. Ed. Aspartic Proteinases. Advances in Experimental Medicine Biology 436:441-444. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5373-1\\_60](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5373-1_60)
- Jones J and Dangl J. 2006. The plant immune system Nature 444: 323-329. DOI: 10.1038/nature05286
- LANREF-CP. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria, Colegio Postgraduados, DGSV-SENASICA, Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez J, Domínguez-Monge S, Esquivel-Chávez F, de la Rosa-Anaya A, Martínez-Bustamante V, Cíntora-Martínez C, López-Bautista V, Juárez-Durán M, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras J, Jiménez-González L, Mendoza-Ramos C, Alanís-Martínez I, Gutiérrez-Espinosa A, Loeza-Kuk E, Valdovinos-Ponce G y Velázquez-Monreal J. 2015. Análisis de hipótesis discriminantes asociadas a la expresión asintomática de CLas en naranja dulce (*Citrus sinensis*) en San José Acateno, Puebla. Versión 5 marzo, 2015. Anexo pp: 2-9.
- Lee JA, Halbert SE, Dawson WO, Robertson CJ, Keesling JE and Singer BH 2015. Asymptomatic spread of Huanglongbing and implications for disease control. Proceedings of the National Academy of Sciences 112(24): 7605–7610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508253112>
- Li J, Brader G, Kariola T and Palva ET. 2006. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. The Plant Journal 46:477-491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02712.x>
- Li X, Zhang Y, Yin L and Lu J. 2016. Overexpression of pathogen-induced grapevine TIR-NB-LRR gene VaRGA1 enhances disease resistance and drought and salt tolerance in *Nicotiana benthamiana*. Protoplasma 254: 1–13. DOI: 10.1007/s00709-016-1005-8
- Liu J, Liu X, Dai L and Wang G. 2007. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. Journal of Genetics Genomics 34:765–776. DOI: 10.1016/S1673-8527(07)60087-3
- Lukasik E and Takken FLW. 2009. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. Current Opinion Plant Biology 12: 427-436. doi:10.1016/j.pbi.2009.03.001
- Mafra V, Martins PK, Francisco CS, 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. BioMed Central 14(1):247. DOI: 10.1186/1471-2164-14-247

- Martinelli F, Ibanez AM, Reagan RL, Davino S and Dandekar AM. 2015. Stress responses in citrus peel: Comparative analysis of host responses to Huanglongbing disease and puffing disorder. *Scientia Horticulturae* 192:409-420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.037>
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW and Young ND. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* 20 (3):317-332. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00606.x>
- Miles G, Stover P, Ramadugu Ch, Keremane ML and Lee RF. 2017. Apparent tolerance to Huanglongbing in citrus-related germplasm. *HortScience* 52(1):31-39. DOI: 10.21273/HORTSCI11374-16
- Mora-Aguilera G, Robles-Garcia P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A, Loeza-Kuk E y González-Gómez R. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32 (2):108-119. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092014000200108&Ing=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092014000200108&Ing=es).
- NAPPO, North American Plant Protection Organization. 2013. PD 01 Virus Tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza virus*-CTV). Protocolos de diagnóstico de la NAPPO [https://www.nappo.org/files/9714/4043/0453/PD\\_01-CTV\\_Citrus-05-03-13-s.pdf](https://www.nappo.org/files/9714/4043/0453/PD_01-CTV_Citrus-05-03-13-s.pdf)
- Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9):2002-2007. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Ramadugu Ch, Munjunath LK, Halbert SE, Ping YD, Roose ML, Stover E and Lee RF. 2016. Long term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in Citrus relative. *Plant Disease* 100(9): 1-64. DOI: 10.1094/PDIS-03-16-0271-RE
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan Y, Bowman KD, Gmitter Jr 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* 4:1-8. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Robles GMM, Orozco SM, Manzanilla RMA, Velázquez MJJ, Mediana UVM y Sanches SE. 2018. Experiencias con Huanglongbing en limón mexicano en el Estado de Colima México. *Citrus Reseach & Technology* 39:12. Doi: [org/10.4322/crt16518](https://doi.org/10.4322/crt16518).
- Roy A, Ananthakrishnan G, Hartung JS and Brlansky RH. 2010. Development and Application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology* 100(10):1077-1088. DOI: 10.1094/PHYTO-04-10-0102

- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B and Lucas WJ. 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Plant Biology* 4:202-209. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00162-X)
- Saponari M, Manjunath K and Yokomi RK. 2007. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal Virological Methods* 147:43-53. DOI:10.1016/j.jviromet.2007.07.026
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria 2019. Pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Última actualización: abril de 2019. Ficha Técnica No. 37. 20p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/458932/37.\\_Pulgon\\_cafe\\_de\\_los\\_citrico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/458932/37._Pulgon_cafe_de_los_citrico.pdf)
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria 2020. Plagas reglamentadas de los cítricos. Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/plagas-reglamentadas-de-los-citricos-110863>.
- Shi Q, Pitino M, Zhang S, Krystel J, Cano LM, Shatters Jr RG, Hall DG and Stover Ed. 2019. Temporal and spatial detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* putative effector transcripts during interaction with Huanglongbing-susceptible, -tolerant, and-resistant citrus hosts. *BMC Plant Biology* 19:122. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1703-4>
- Simoes I, Faro R, Bur D and Faro C. 2007. Characterization of recombinant *CDR1*, an *Arabidopsis* aspartic proteinase involved in disease resistance. *Journal of Biological Chemistry* 282(43):31358–31365. DOI: 10.1074/jbc.M702477200
- Stahl E, Hilfiker O and Reymond P. 2018. Plant-arthropod interactions: who is the winner? *The Plant Journal* 93:703-728. DOI: 10.1111/tpj.13773
- Takken F, Albrecht M and Tameling WI. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 9(4): 383–390. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.05.009
- Takken FLW and Govere A. 2012. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion Plant Biology* 15: 375-384. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.05.001
- Tameling WL, Vossen, JH, Albrecht M, Lengauer T, Berden JA, Haring MA and Cornelissen BJC, F.L.W. 2006. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant Physiology* 140(4):1233-1245; DOI: 10.1104/pp.105.073510
- Tatineni S and Dawson W. 2012. Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus Tristeza Virus*. *Journal of Virology* 7850 –7857. DOI:10.1128/JVI.00916-1
- Taylor SC, Nadaeu K, Abbasi M, Lachance C, Nquven M and Fenrich J. 2019. The ultimate qPCR experiment: Producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in Biotechnology* 37(7): 761-774. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.12.002

- Thomma BJ, Nürnberger T and Joosten MH. 2011. Of PAMPs and Effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* 23(1): 4-15. DOI: 10.1105/tpc.110.082602
- Tian Y, Lu XY, Peng LS, Fang J. 2006. The structure and function of plant WRKY transcription factors. *Yi Chuan* 28(12):1607-1612. doi:10.1360/yc-006-1607
- University of Florida. 2018. Citrus Research and Education Center. Symptoms. Institute of Food and Agricultural Sciences. Lake Alfred, FL 33850, USA. <https://crec.ifas.ufl.edu/hlb-information/greening/symptoms/>
- Wang Y, Zhou L, Yu X, Stover E, Luo F and Duan Y. 2016. Transcriptome profiling of Huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7:933. DOI: 10.3389/fpls.2016.00933
- Xi Z, Xue-Iu L, Bing-Hai L, Chang-young Z and Xue-Feng W. 2018. Development of a sensitive and reliable droplet digital PCR assay for the detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Journal of Integrative Agriculture* 17(2):483-487. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61815-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61815-X)
- Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, Dixon RA and Lamb CH. 2004. An extracellular aspartic protease functions as an *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal* 23(4):280-290. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600086>
- Xu Y, Liu F, Zhu S and Li X. 2018. The maize NBS-LRR gene ZmNBS25 enhances disease resistance in rice and Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 9(1033):13. DOI: 10.3389/fpls.2018.01033
- Yang F, Wang G, Jiang B, Liu Y, Wu G and Hong N. 2013. Differentially expressed genes and temporal and spatial expression of genes during interactions between Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and a severe *Citrus Tristeza Virus* isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 83:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.03.001>
- Ying X, Redfern B, Gmitter FG and Deng Z. 2020. Heterologous expression of the constitutive disease resistance 2 and 8 genes from *Poncirus trifoliata* restored the hypersensitive response and resistance of Arabidopsis cdr1 mutant to bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plants* 9(821):12. DOI: 10.3390/plants9070821
- Yu Q, Chen Ch, Du D, Huang M, Yao J, Yu F, Brlasnsky R and Gmitter FG. 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. DOI:10.1038/hortres.2017.63

## CONCLUSIONES GENERALES

1. Se desarrolló un protocolo no comercial de RT-qPCR para la cuantificación relativa de *CDR13* empleando como genes de referencia: *GAPDH*, *Actin* y *F-Box* para la normalización de estudios de expresión génica diferencial, de extracciones de ARN de nervadura central de hojas *Citrus sinensis* con tres condiciones fitosanitarias: sana, positiva a CLas y positiva a CTV.
2. Para conseguir la síntesis de  $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADNc fue necesario emplear:  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ARN, 500 U de M-MLV Reverse Transcriptase, sin embargo, el factor primordial fue aumentar a 100 min el tiempo de incubación, prolongando la actividad de la enzima. La optimización principal de la mezcla de reacción para qPCR fue la reducción a  $5 \mu\text{L}$  de SsoAdvanced™ SYBR® Green supermix (Bio-Rad) con un volumen final de  $10 \mu\text{L}$ , lo cual no altera los Cq esto permite la reducción en los costos en reactivos.
3. La estandarización de un protocolo no comercial utilizando RT-qPCR, permitió realizar un estudio de expresión de genes de interés en naranjo dulce infectado con CTV raza T30 y CLas en condición asintomática (CLas-A) y sintomática (CLas-S).
4. Bajo las condiciones de la investigación, fue posible detectar CTV en nervaduras de hojas a los 3.5 MDI, el inóculo CLas-S en el 4.5 MDI y CLas-A al 6.0 MDI.
5. La expresión a 6 MDI en respuesta a CLas-A fue mayor para *TIR-NBS-LRR* y *NB-ARC*, asociados a proteínas R, que se activan rápidamente posiblemente para activar moléculas que desencadenan inmunidad.
6. La expresión de estos genes en respuesta a CLas-S se detectó a los 12 MDI con valores promedio similares a los alcanzados por CLas-A. Esta expresión tardía podría explicar por qué la planta expresa síntomas con esta tipo de cepa.
7. La expresión del gen relacionado con el factor de transcripción *WRKY70* asociado al equilibrio en las rutas de defensa dependientes de ácido salicílico y jasmasónico, también se expresan en mayor proporción en plantas con CLas-A a 6 MDI, coincidiendo con la más baja expresión en plantas con CLas-S.
8. La expresión de *CDR13* y *PP2-B13* no fue posible asociarla en respuesta infección por CLas.

9. A pesar de que naranjo agrio como portainjerto es susceptible a CTV, los niveles de expresión de los genes estudiados fueron mayores, que aquellos que se obtienen con cualquiera de las cepas de CLas al 6T. . Esto podría explicar, al menos en parte, porque la raza moderada T30 es asintomática en naranja dulce/naranja agrio.
10. Es importante mencionar que tanto CLas-A y la cepa T30 son patógenos restringidos al floema y asintomáticos y la intensidad de activación de genes en el virus vs la bacteria es diferente, sin embargo la tendencia de activación de los genes son similares

## APÉNDICE

### ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ARN:** Ácido ribonucleico

**Cq:** Ciclo de amplificación

**CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

**DNasa:** Enzima que polimeriza el ADN

**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**Gen:** Unidad física fundamental de la herencia

**Kb:** kilobase

**ARNm:** ARN mensajero

**ng:** nanogramo

**nM:** nanoMolar

**NTC:** Control sin plantilla

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa: PCR cuantitativa

**qPCR:** PCR cuantitativa

**rmp:** revoluciones por minuto

**RNasa:** Enzima que polimeriza ARN

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa de transcripción inversa

**SYBR-Green:** Fluoróforo específico de ADN bicentenario

**TBE:** Tris Borato-EDTA

**Tm:** temperatura de fusión

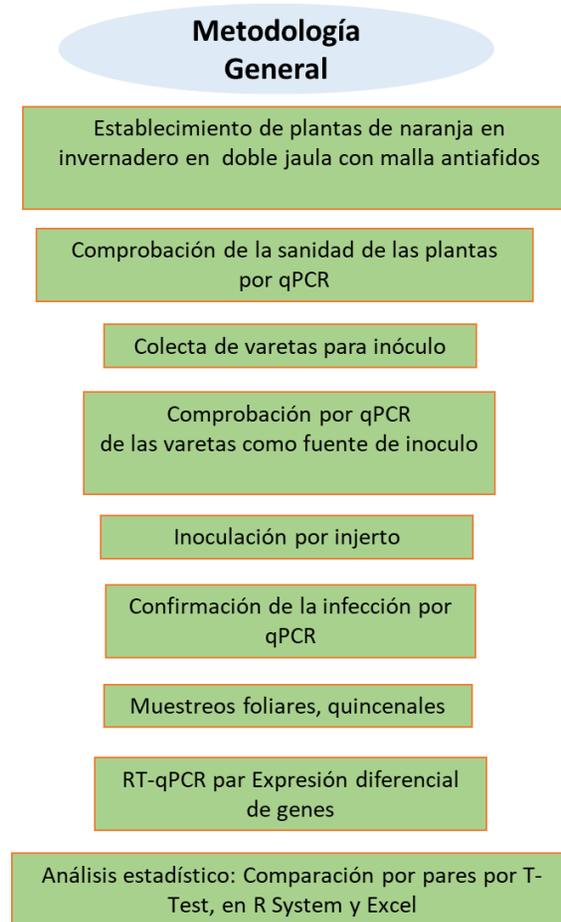
**μL:** microlitro

**3':** átomo 3 del carbono de la desoxirribosa

**5':** átomo 5 del carbono de la desoxirribosa

## ANEXO 1

Metodología para la expresión de genes en naranjo dulce/naranjo agrio.



Ubicación de la toma de muestra en la planta, la flecha roja indica la ubicación de la posible toma de hoja.



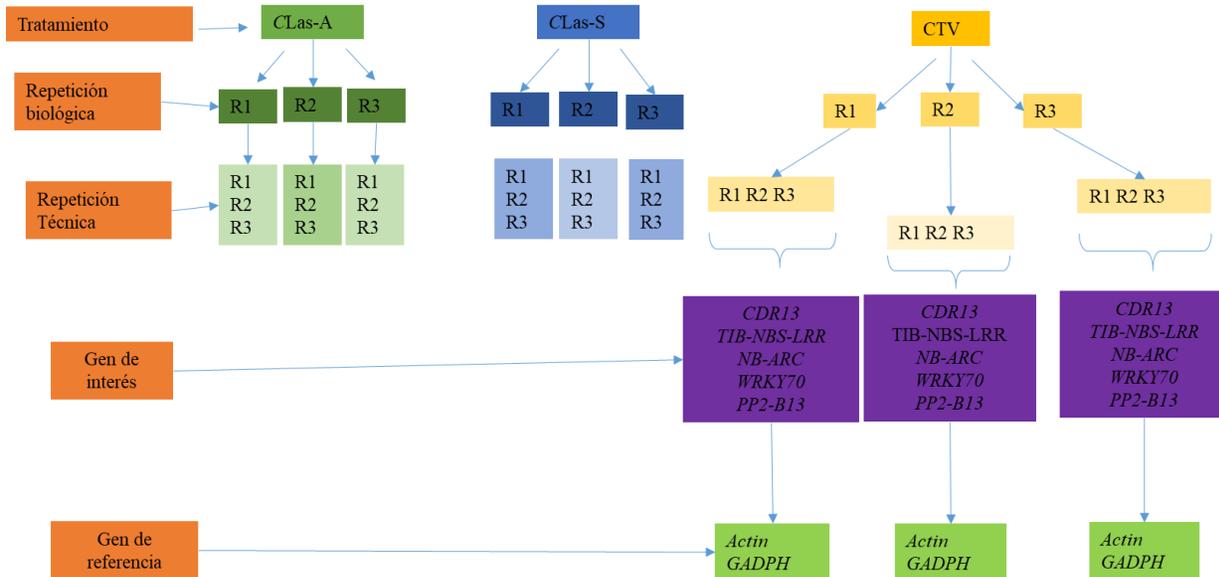
## **Protocolo CTAB 2% para extracción de ANA/ARN total de tejido vegetal**

Doyle y Doyle, 1987 - Modificado por Hernández V.- LANREF., 2018. (Paso 2)

V4Feb2018

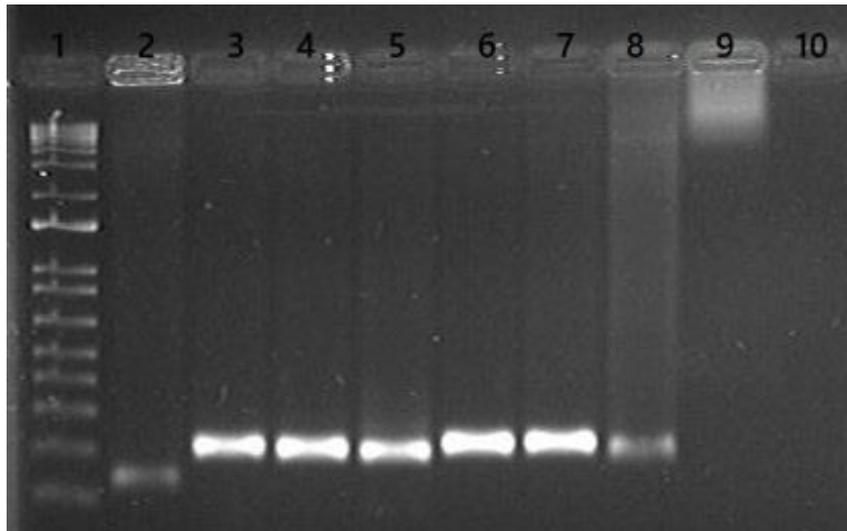
1. Depositar en un tubo eppendor 0.1 gramos de tejido vegetal. Es importante mantener la muestra en condiciones de baja temperatura (usar cooler).
2. Colocar dos balines de 3/16 dentro del tubo. Agregar 600  $\mu$ L de buffer salino. (si el tejido se ve oxidado agregar 800  $\mu$ L de buffer salino).
3. Programar el macerador de tejido a 30 f/s (frecuencias por segundo) por un tiempo de 5 minutos (verificar no se rompan los tubos).
4. Transcurrido el tiempo, centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos a 4 °C.
5. Descartar el sobrante y retirar los balines de la muestra.
6. Posteriormente, agregar 600 $\mu$ L de CTAB al 2% y 3 $\mu$ L de B-mercaptoetanol. Dar Vortex a la muestra por 10 segundos e incubar a 55°C por un lapso de 30 minutos (mezclar bien el B-mercaptoetanol).
7. Agregar 400 $\mu$ L de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1 y mezclar en vortex por 10 segundos.
8. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 14 000 rpm.
9. Colectar 500  $\mu$ L de la fase acuosa en un tubo nuevo. Evitar que se mezclen las fases, por lo que se recomienda extraer la fase acuosa en volúmenes de 200  $\mu$ L. Desechar la fase sólida.
10. Agregar 50  $\mu$ L de acetato y 500 $\mu$ L de isopropanol e incubar por 10 minutos a -20 °C. (Puede quedarse precipitando toda la noche)
11. Consecutivamente centrifugar por 10 minutos a 14 000 rpm a 4 °C y descartar el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla que se formó.
12. Adicionar 1000  $\mu$ L de etanol al 70% centrifugar un minuto a 14 000 rpm a 4 °C.
13. Secar la muestra a temperatura ambiente de tal modo que se evaporen los residuos de etanol dentro del tubo el lapso aproximado es de 20 minutos.
14. Resuspender la pastillas en 50  $\mu$ L de agua libre de RNAsas.

Diseño del experimento de RT-qPCR, que consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas, por cinco genes de interés y dos genes de referencia.



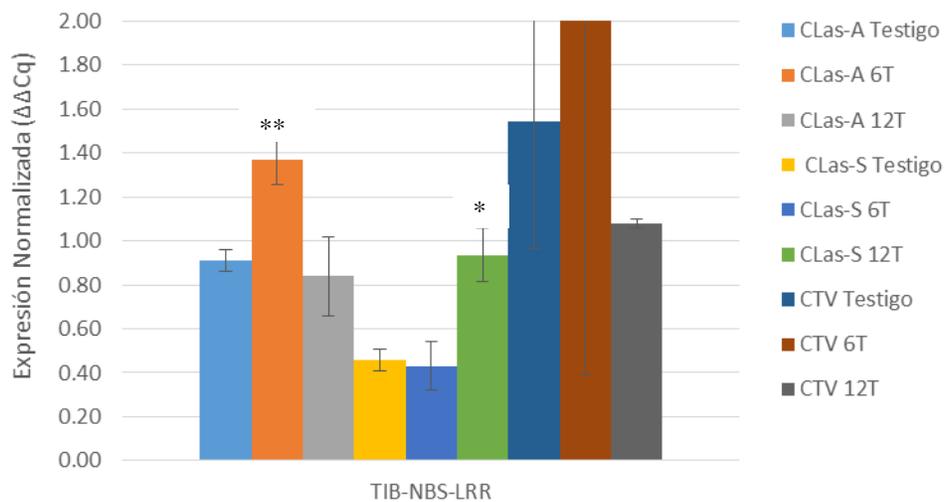
Ejemplo de la configuración del diseño de la placa, en el que se puede observar para el inóculo de CLas-S, tres replicas biológicas con tres replicas técnicas, por cinco genes de interés, por dos genes de referencia, para el tiempo 12 (12T).

	Replica biológica 1			Replica biológica 2			Replica biológica 3			NTC		
	Replicas técnicas											
	R1			R2			R3					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gen <i>CDR13</i>	Unk-184 CDR13 Clas-S-12T-M09	Unk-184 CDR13 Clas-S-12T-M09	Unk-184 CDR13 Clas-S-12T-M09	Unk-185 CDR13 Clas-S-12T-M30	Unk-185 CDR13 Clas-S-12T-M30	Unk-185 CDR13 Clas-S-12T-M30	Unk-186 CDR13 Clas-S-12T-M48	Unk-186 CDR13 Clas-S-12T-M48	Unk-186 CDR13 Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
Gen <i>WRKY70</i>	Unk-187 WRKY70 Clas-S-12T-M09	Unk-187 WRKY70 Clas-S-12T-M09	Unk-187 WRKY70 Clas-S-12T-M09	Unk-188 WRKY70 Clas-S-12T-M30	Unk-188 WRKY70 Clas-S-12T-M30	Unk-188 WRKY70 Clas-S-12T-M30	Unk-189 WRKY70 Clas-S-12T-M48	Unk-189 WRKY70 Clas-S-12T-M48	Unk-189 WRKY70 Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
Gen <i>TIR-NBS-LRR</i>	Unk-190 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M09	Unk-190 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M09	Unk-190 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M09	Unk-191 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M30	Unk-191 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M30	Unk-191 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M30	Unk-192 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M48	Unk-192 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M48	Unk-192 TIB-NBS-LRR Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
Gen <i>GAPDH</i>	Unk-193 GAPDH Clas-S-12T-M09	Unk-193 GAPDH Clas-S-12T-M09	Unk-193 GAPDH Clas-S-12T-M09	Unk-194 GAPDH Clas-S-12T-M30	Unk-194 GAPDH Clas-S-12T-M30	Unk-194 GAPDH Clas-S-12T-M30	Unk-195 GAPDH Clas-S-12T-M48	Unk-195 GAPDH Clas-S-12T-M48	Unk-195 GAPDH Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
Gen <i>Actin</i>	Unk-196 Actin Clas-S-12T-M09	Unk-196 Actin Clas-S-12T-M09	Unk-196 Actin Clas-S-12T-M09	Unk-197 Actin Clas-S-12T-M30	Unk-197 Actin Clas-S-12T-M30	Unk-197 Actin Clas-S-12T-M30	Unk-198 Actin Clas-S-12T-M48	Unk-198 Actin Clas-S-12T-M48	Unk-198 Actin Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
Gen <i>NB-ARC</i>	Unk-199 NB-ACR Clas-S-12T-M09	Unk-199 NB-ACR Clas-S-12T-M09	Unk-199 NB-ACR Clas-S-12T-M09	Unk-200 NB-ACR Clas-S-12T-M30	Unk-200 NB-ACR Clas-S-12T-M30	Unk-200 NB-ACR Clas-S-12T-M30	Unk-201 NB-ACR Clas-S-12T-M48	Unk-201 NB-ACR Clas-S-12T-M48	Unk-201 NB-ACR Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
Gen <i>PP2-B13</i>	Unk-202 PP2-B13 Clas-S-12T-M09	Unk-202 PP2-B13 Clas-S-12T-M09	Unk-202 PP2-B13 Clas-S-12T-M09	Unk-203 PP2-B13 Clas-S-12T-M30	Unk-203 PP2-B13 Clas-S-12T-M30	Unk-203 PP2-B13 Clas-S-12T-M30	Unk-204 PP2-B13 Clas-S-12T-M48	Unk-204 PP2-B13 Clas-S-12T-M48	Unk-204 PP2-B13 Clas-S-12T-M48	NTC	NTC	NTC
	Neg H2O	Neg H2O	Neg H2O	Neg H2O								



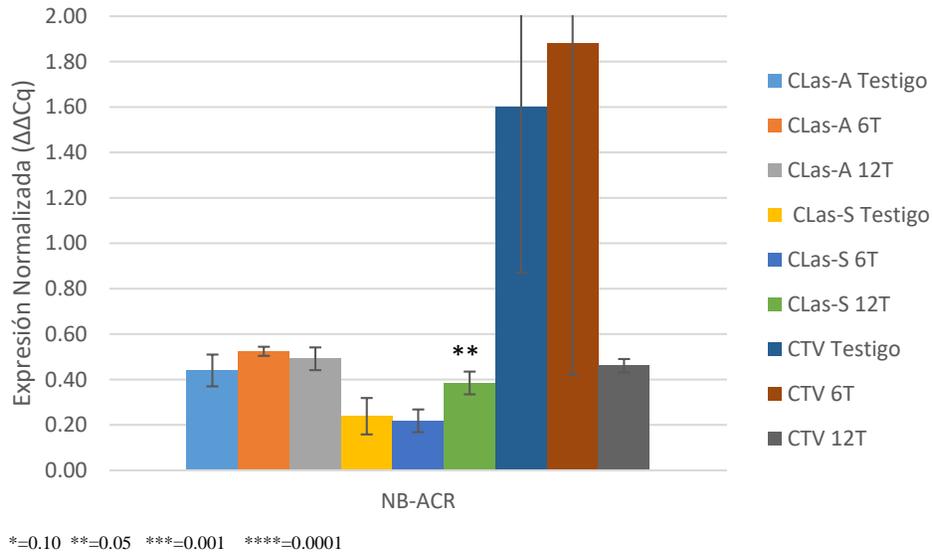
Amplificación de los ampliacones productos de qPCR, en los que se puede visualizar, alta especificidad de los primers empleados. Carril 1) Marcador molecular Lander® 1000 Kb, 2) *CDRI3*, 3) *WRKY70*, 4) *TIB-NBS-LRR*, 5) *GAPDH*, 6) *Actin*, 7) *NB-ARC*, 8) *PP2-B13*, 9) NTC, 10) H<sub>2</sub>O

Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar para Testigo, 6T y 12T de los tres inóculos para *TIB-NBS-LRR*.

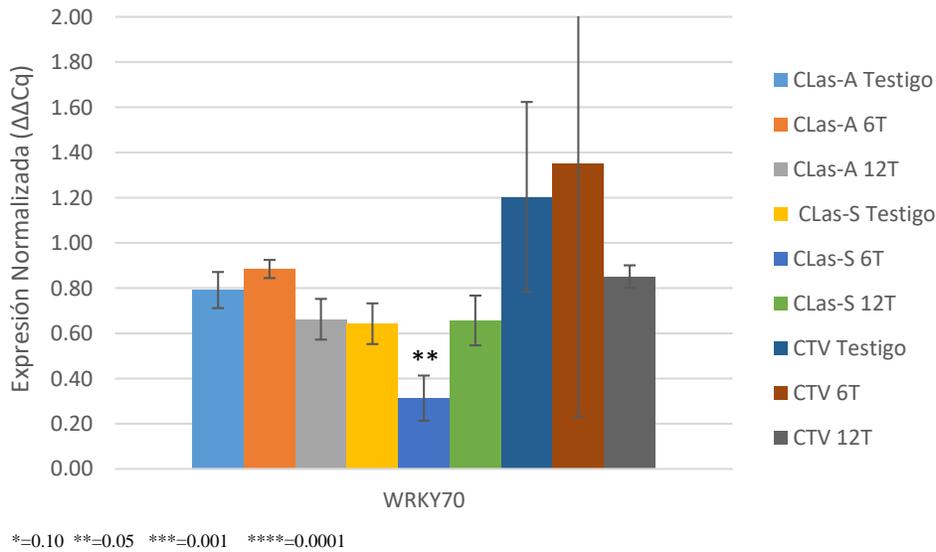


\*=0.10, \*\*=0.05, \*\*\*=0.001, \*\*\*\*=0.0001

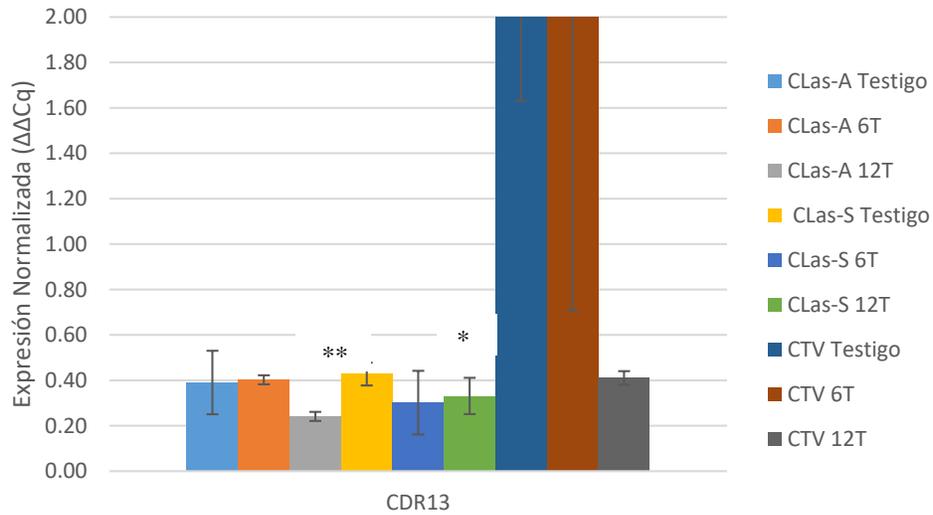
Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar para Testigo, 6T y 12T de los tres inóculos *NB-ARC*.



Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar para Testigo, 6T y 12T de los tres inóculos para *WRKY70*.

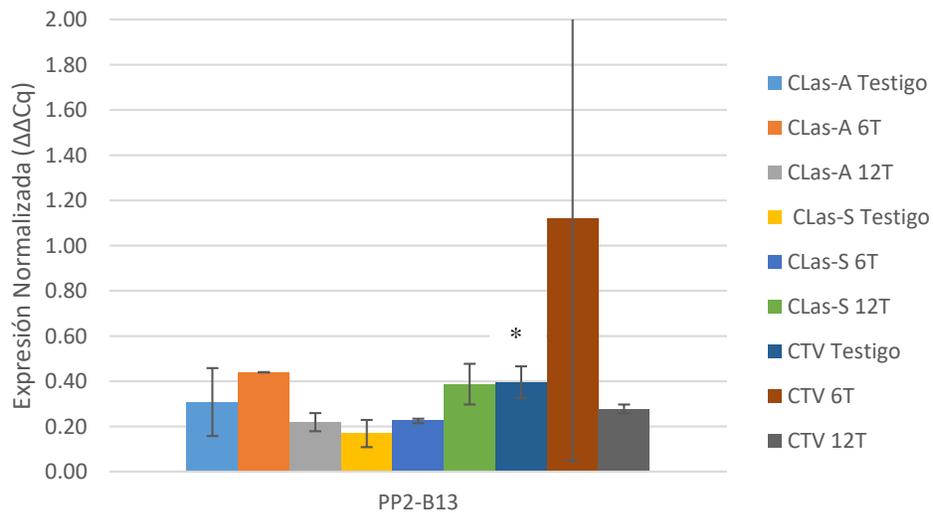


Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar para Testigo, 6T y 12T de los tres inóculos para el gen *CDR13*.



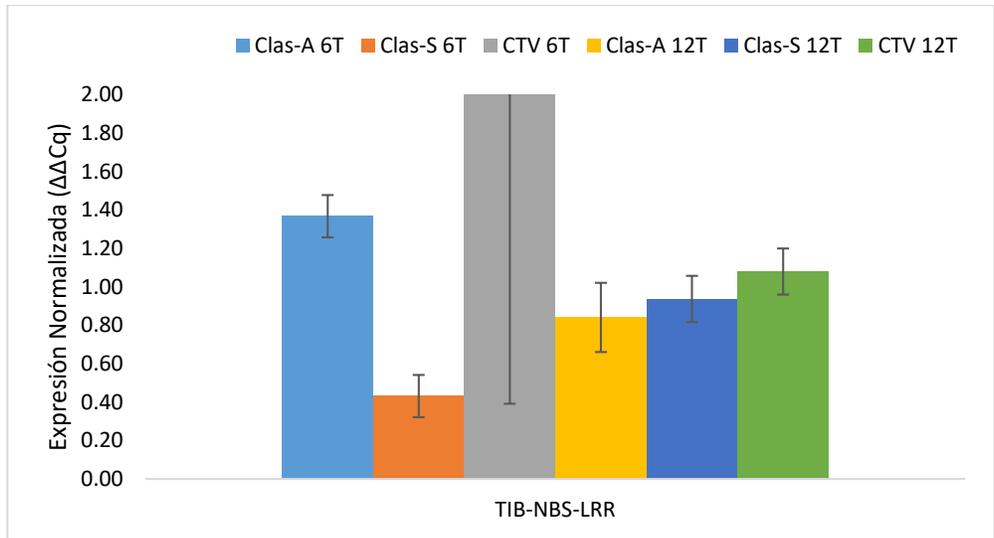
\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar para Testigo, 6T y 12T de los tres inóculos para el gen *PP2-B13*.



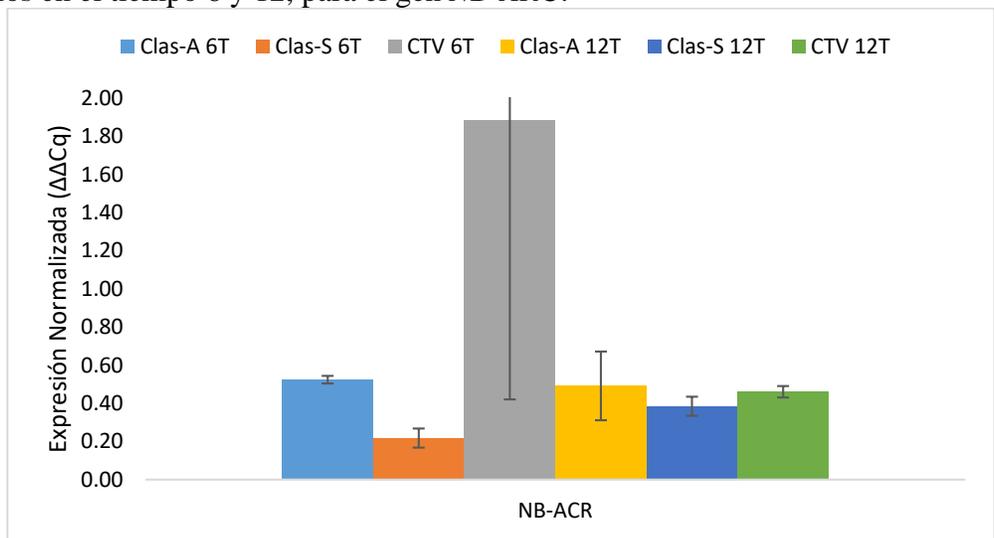
\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar de los inóculos en el tiempo 6 y 12, para el gen *TIB-NBS-LRR*.



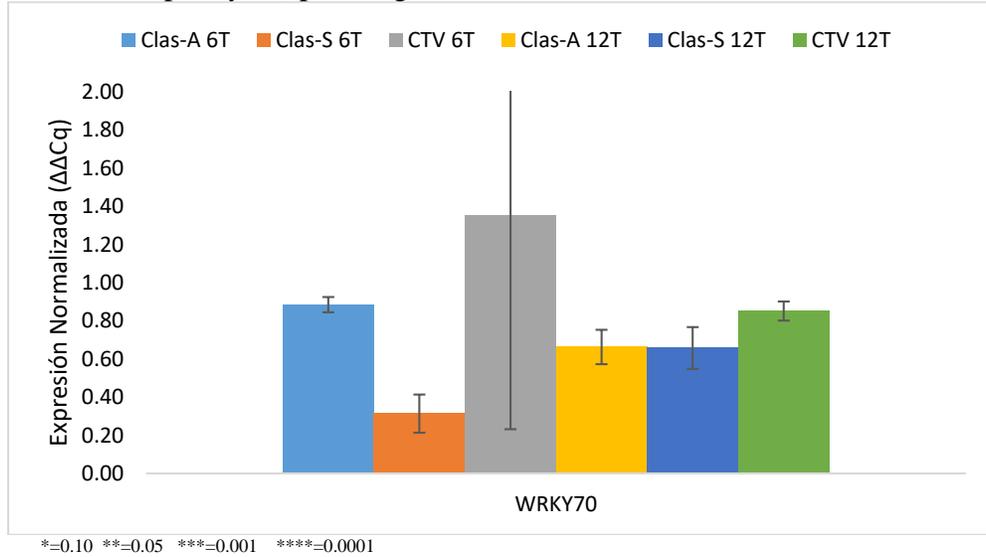
\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar de los inóculos en el tiempo 6 y 12, para el gen *NB-ARC*.

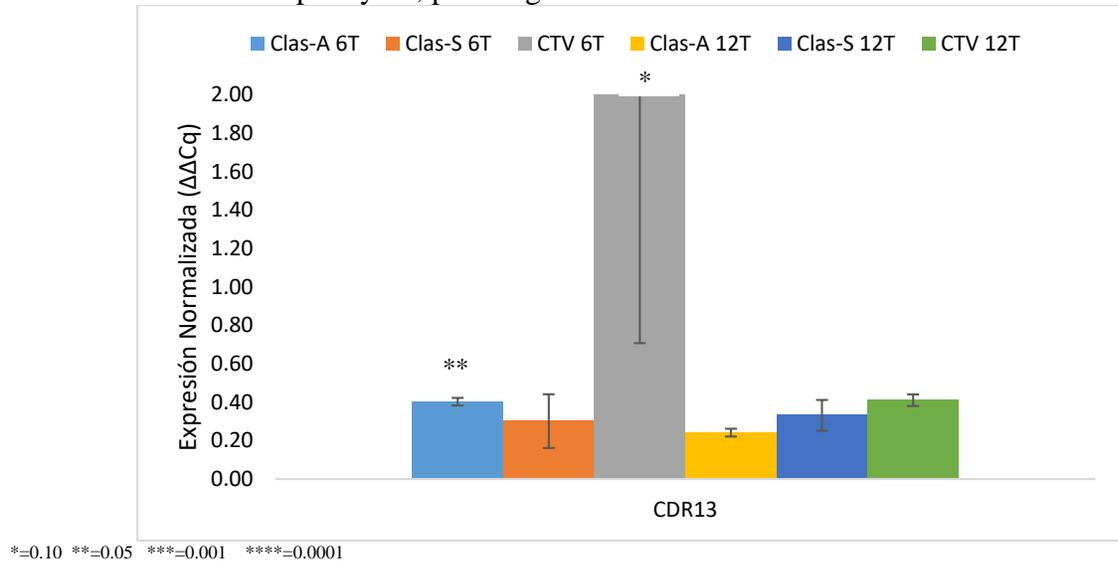


\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

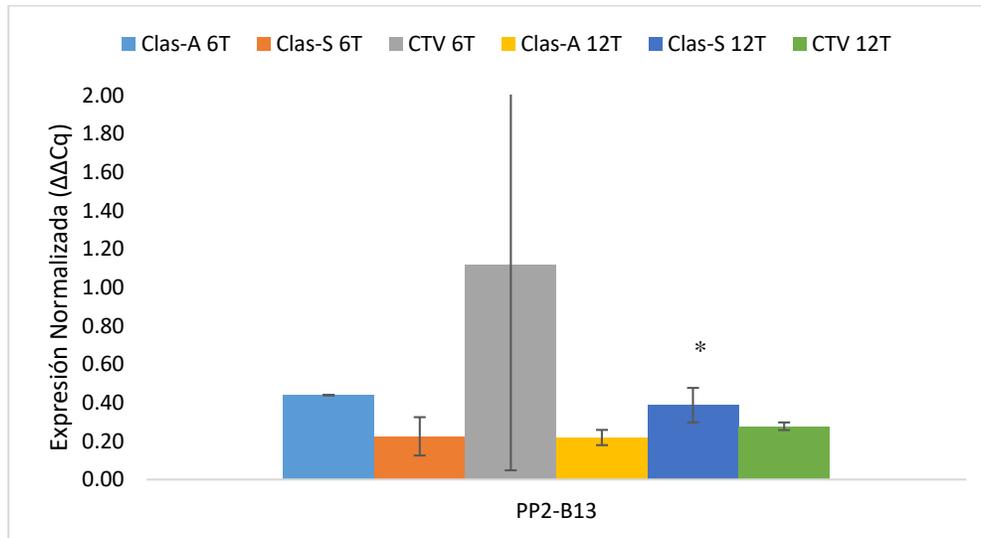
Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar de los inóculos en el tiempo 6 y 12, para el gen *WRKY70*.



Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar de los inóculos en el tiempo 6 y 12, para el gen *CDR13*.



Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas, desviación estándar de los inóculos en el tiempo 6 y 12, para el gen *PP2-B13*.



\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

---

**Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas**

Inóculo	Rep. Biol	<i>CDR13</i>	<i>NB-ARC</i>	<i>PP2-B13</i>	<i>TIB-NBS-LRR</i>	<i>WRKY70</i>
CLasA Testigo	1	0.301	0.405	0.238	0.858	0.790
CLasA Testigo	2	0.323	0.508	0.485	0.930	0.875
CLasA Testigo	3	0.548	0.368	0.201	0.944	0.710
CLasS Testigo	1	0.412	0.292	0.193	0.449	0.562
CLasS Testigo	2	0.385	0.281	0.209	0.413	0.627
CLasS Testigo	3	0.487	0.141	0.104	0.506	0.739
CTV Testigo	1	3.457	2.355	0.482	2.091	1.603
CTV Testigo	2	2.836	1.546	0.345	1.609	1.234
CTV Testigo	3	1.540	0.902	0.362	0.933	0.774
CLas-A 6T	1	0.401	0.505	0.438	1.246	0.909
CLas-A 6T	2	0.421	0.531	0.440	1.400	0.834
CLas-A 6T	3	0.385	0.536	0.440	1.458	0.911
CLas-S 6T	1	0.457	0.267	0.220	0.558	0.423
CLas-S 6T	2	0.239	0.177	0.230	0.384	0.286
CLas-S 6T	3	0.209	0.210	0.225	0.351	0.231
CTV 6T	1	1.626	1.008	0.461	1.007	0.670
CTV 6T	2	5.998	3.568	2.351	3.983	2.644
CTV 6T	3	1.877	1.066	0.543	1.195	0.742
CLas-A 12T	1	0.225	0.439	0.252	0.894	0.576
CLas-A 12T	2	0.261	0.491	0.178	0.640	0.750
CLas-A 12T	3	0.238	0.544	0.226	0.987	0.661
CLas-S 12T	1	0.241	0.491	0.219	0.841	0.662
CLas-S 12T	2	0.331	0.385	0.387	0.937	0.657
CLas-S 12T	3	0.410	0.460	0.277	1.080	0.851
CTV 12T	1	0.384	0.436	0.263	1.063	0.797
CTV 12T	2	0.403	0.490	0.275	1.072	0.902
CTV 12T	3	0.445	0.455	0.294	1.104	0.853

---

**Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio dos repeticiones biológicas eliminando la repetición-outlier**

Inóculo	Rep. Biol	<i>CDR13</i>	<i>NB-ARC</i>	<i>PP2B13</i>	<i>TIBNBSLRR</i>	<i>WRKY70</i>
CLasA Testigo	1	0.301	0.405	0.238		0.790
CLasA Testigo	2	0.323	0.508		0.930	
CLasA Testigo	3		0.368	0.201	0.944	0.710
CLasS Testigo	1	0.412	0.292	0.193	0.449	0.562
CLasS Testigo	2	0.385	0.281		0.413	0.627
CLasS Testigo	3			0.104		0.739
CTV Testigo	1	3.457	2.355		2.091	1.603
CTV Testigo	2	2.836	1.546	0.345	1.609	1.234
CTV Testigo	3	1.540		0.362		
CLas-A 6T	1	0.401	0.505	0.438	1.246	0.909
CLas-A 6T	2	0.421	0.531	0.440	1.400	
CLas-A 6T	3		0.536	0.440	1.458	0.911
CLas-S 6T	1		0.267	0.220		
CLas-S 6T	2	0.239		0.230	0.384	0.286
CLas-S 6T	3	0.209	0.210	0.225	0.351	0.231
CTV 6T	1	1.626	1.008	0.461	1.007	0.670
CTV 6T	2					
CTV 6T	3	1.877	1.066	0.543	1.195	0.742
CLas-A 12T	1	0.225	0.439	0.252	0.894	0.576
CLas-A 12T	2	0.261	0.491			0.750
CLas-A 12T	3	0.238		0.226	0.987	0.661
CLas-S 12T	1	0.241	0.491	0.219	0.841	0.662
CLas-S 12T	2	0.331			0.937	0.657
CLas-S 12T	3	0.410	0.460	0.277	1.080	
CTV 12T	1		0.436	0.263	1.063	0.797
CTV 12T	2	0.403	0.490	0.275	1.072	0.902
CTV 12T	3	0.445	0.455	0.294	1.104	0.853

**Expresión Normalizada ( $\Delta\Delta Cq$ ) promedio dos repeticiones biológicas  
eliminando la repetición outlier fue sustituida por el valor promedio de las  
2 REPETICIONES consistentes para obtener tres datos**

Inóculo	Rep. Biol	<i>CDR13</i>	<i>NB-ARC</i>	<i>PP2-B13</i>	<i>TIB-NBS-LRR</i>	<i>WRKY70</i>
CLasA Testigo	1	0.30	0.41	0.24	0.94	0.79
CLasA Testigo	2	0.32	0.39	0.22	0.93	0.75
CLasA Testigo	3	0.31	0.37	0.20	0.94	0.71
CLasS Testigo	1	0.41	0.29	0.19	0.45	0.56
CLasS Testigo	2	0.39	0.28	0.21	0.41	0.63
CLasS Testigo	3	0.40	0.29	0.20	0.43	0.59
CTV Testigo	1	3.46	1.22	0.35	2.09	1.60
CTV Testigo	2	2.84	1.55	0.34	1.61	1.23
CTV Testigo	3	3.15	0.90	0.36	1.85	1.42
CLas-A 6T	1	0.40	0.51	0.44	1.25	0.91
CLas-A 6T	2	0.42	0.53	0.44	1.40	0.83
CLas-A 6T	3	0.38	0.54	0.44	1.46	0.91
CLas-S 6T	1	0.22	0.19	0.22	0.37	0.26
CLas-S 6T	2	0.24	0.18	0.23	0.38	0.29
CLas-S 6T	3	0.21	0.21	0.22	0.35	0.23
CTV 6T	1	1.63	1.01	0.46	1.01	0.67
CTV 6T	2	1.75	1.04	0.50	1.10	0.71
CTV 6T	3	1.88	1.07	0.54	1.19	0.74
CLas-A 12T	1	0.23	0.44	0.25	0.89	0.58
CLas-A 12T	2	0.26	0.49	0.24	0.94	0.62
CLas-A 12T	3	0.24	0.47	0.23	0.99	0.66
CLas-S 12T	1	0.24	0.49	0.22	1.01	0.66
CLas-S 12T	2	0.33	0.38	0.25	0.94	0.66
CLas-S 12T	3	0.41	0.460	0.277	1.08	0.44
CTV 12T	1	0.38	0.44	0.26	1.06	0.80
CTV 12T	2	0.40	0.49	0.27	1.07	0.90
CTV 12T	3	0.44	0.46	0.29	1.10	0.85

**Cuantificación Relativa( $\Delta Cq$ )de promedio de tres repeticiones biológicas**

Inóculo	Rep. Biol	<i>CDR13</i>	<i>NB-ARC</i>	<i>PP2-B13</i>	<i>TIB-NBS-LRR</i>	<i>WRKY70</i>
CLas-A Testigo	1	0.172	0.157	0.117	0.170	0.184
CLas-A Testigo	2	0.171	0.183	0.222	0.172	0.189
CLas-A Testigo	3	0.124	0.057	0.039	0.074	0.066
CLas-S Testigo	1	0.071	0.067	0.074	0.059	0.065
CLas-S Testigo	2	0.265	0.255	0.317	0.215	0.288
CLas-S Testigo	3	0.081	0.031	0.038	0.064	0.083
CTV Testigo	1	0.103	0.123	0.161	0.097	0.120
CTV Testigo	2	0.084	0.080	0.130	0.075	0.092
CTV Testigo	3	0.024	0.024	0.029	0.023	0.030
CLas-A 6T	1	0.648	0.554	0.611	0.700	0.599
CLas-A 6T	2	0.109	0.093	0.098	0.126	0.088
CLas-A 6T	3	0.149	0.141	0.147	0.196	0.143
CLas-S 6T	1	0.153	0.118	0.163	0.142	0.095
CLas-S 6T	2	0.036	0.035	0.076	0.044	0.029
CLas-S 6T	3	0.024	0.032	0.057	0.031	0.018
CTV 6T	1	0.444	0.484	0.435	0.432	0.463
CTV 6T	2	0.111	0.116	0.151	0.116	0.124
CTV 6T	3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
CLas-A 12T	1	0.069	0.105	0.109	0.077	0.068
CLas-A 12T	2	0.024	0.035	0.023	0.017	0.026
CLas-A 12T	3	0.045	0.081	0.061	0.053	0.048
CLas-S 12T	1	0.060	0.068	0.197	0.058	0.058
CLas-S 12T	2	0.240	0.174	0.207	0.138	0.106
CLas-S 12T	3	0.075	0.072	0.094	0.074	0.080
CTV 12T	1	0.303	0.270	0.295	0.237	0.068
CTV 12T	2	0.331	0.315	0.320	0.249	0.026
CTV 12T	3	0.244	0.196	0.229	0.171	0.048

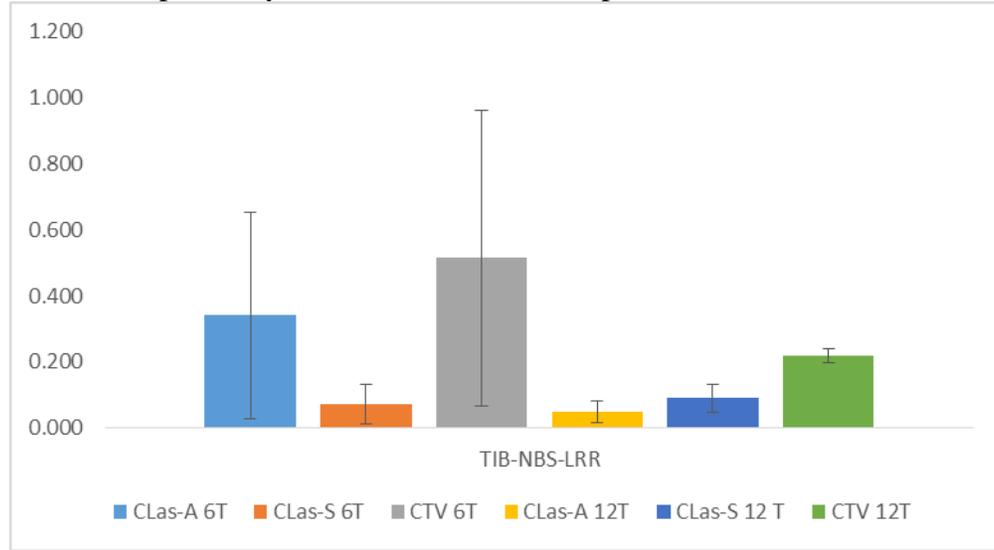
**Cuantificación Relativa( $\Delta Cq$ ) de promedio dos repeticiones biológicas eliminando la repetición-outlier**

Inóculo	Rep. Biol	<i>CDR13</i>	<i>NB-ARC</i>	<i>PP2-B13</i>	<i>TIB-NBS-LRR</i>	<i>WRKY70</i>
CLas-A Testigo	1	0.172	0.157	0.117	0.170	0.184
CLas-A Testigo	2	0.171	0.183	0.222	0.172	0.189
CLas-A Testigo	3					
CLas-S Testigo	1	0.071	0.067	0.074	0.059	0.065
CLas-S Testigo	2					
CLas-S Testigo	3	0.081	0.031	0.038	0.064	0.083
CTV Testigo	1	0.103	0.123	0.161	0.097	0.120
CTV Testigo	2	0.084	0.080	0.130	0.075	0.092
CTV Testigo	3					
CLas-A 6T	1					
CLas-A 6T	2	0.109	0.093	0.098	0.126	0.088
CLas-A 6T	3	0.149	0.141	0.147	0.196	0.143
CLas-S 6T	1					
CLas-S 6T	2	0.036	0.035	0.076	0.044	0.029
CLas-S 6T	3	0.024	0.032	0.057	0.031	0.018
CTV 6T	1	0.444	0.484	0.435	0.432	0.463
CTV 6T	2	0.111	0.116	0.151	0.116	0.124
CTV 6T	3					
CLas-A 12T	1	0.069	0.105		0.077	0.068
CLas-A 12T	2	0.024		0.023		0.026
CLas-A 12T	3	0.045	0.081	0.061	0.053	0.048
CLas-S 12T	1	0.060	0.068	0.197	0.058	
CLas-S 12T	2			0.207		0.106
CLas-S 12T	3	0.075	0.072		0.074	0.080
CTV 12T	1	0.303	0.270	0.295	0.237	0.068
CTV 12T	2	0.331	0.315	0.320	0.249	0.026
CTV 12T	3	0.244	0.196	0.229	0.171	0.048

**Cuantificación Relativa( $\Delta Cq$ ) de promedio de tres repeticiones biológicas promedio dos repeticiones biológicas eliminando la repetición outlier fue sustituida por el valor promedio de las 2 REPETICIONES consistentes para obtener tres datos**

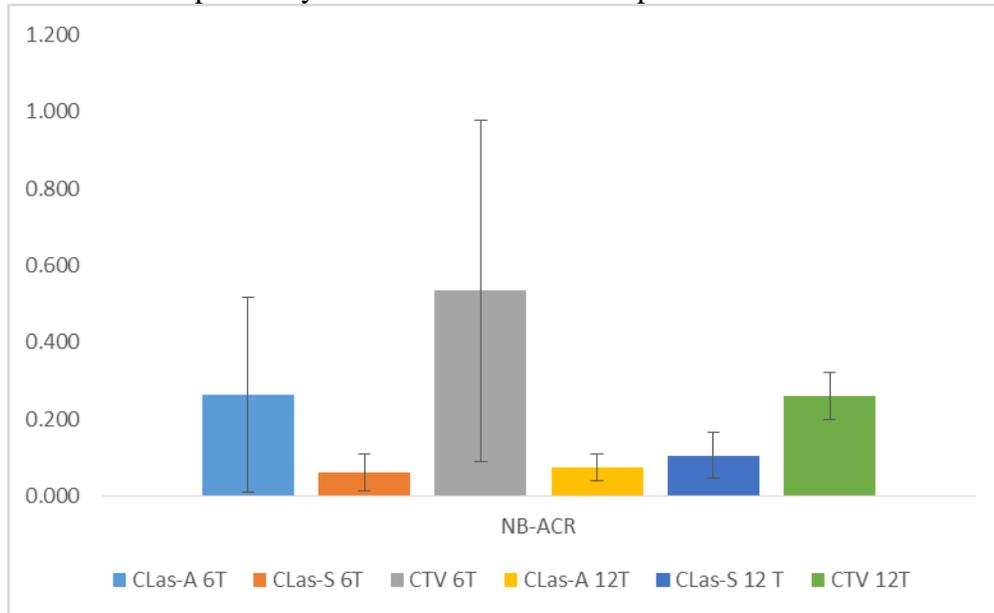
Inóculo	Rep. Biol	TIB-				
		<i>CDR13</i>	<i>NB- ARC</i>	<i>PP2- B13</i>	<i>NBS- LRR</i>	<i>WRKY70</i>
CLas-A						
Testigo	1	0.172	0.157	0.117	0.170	0.184
CLas-A						
Testigo	2	0.171	0.183	0.222	0.172	0.189
CLas-A						
Testigo	3	0.172	0.170	0.170	0.171	0.186
CLas-S						
Testigo	1	0.071	0.067	0.074	0.059	0.065
CLas-S						
Testigo	2	0.076	0.049	0.056	0.062	0.074
CLas-S						
Testigo	3	0.081	0.031	0.038	0.064	0.083
CTV Testigo	1	0.103	0.052	0.161	0.097	0.120
CTV Testigo	2	0.084	0.080	0.130	0.075	0.092
CTV Testigo	3	0.093	0.024	0.145	0.086	0.106
CLas-A 6T	1	0.129	0.117	0.122	0.161	0.116
CLas-A 6T	2	0.109	0.093	0.098	0.126	0.088
CLas-A 6T	3	0.149	0.141	0.147	0.196	0.143
CLas-S 6T	1	0.030	0.033	0.067	0.037	0.023
CLas-S 6T	2	0.036	0.035	0.076	0.044	0.029
CLas-S 6T	3	0.024	0.032	0.057	0.031	0.018
CTV 6T	1	0.444	0.484	0.435	0.432	0.463
CTV 6T	2	0.111	0.116	0.151	0.116	0.124
CTV 6T	3	0.277	0.300	0.293	0.274	0.293
CLas-A 12T	1	0.069	0.105	0.109	0.077	0.068
CLas-A 12T	2	0.057	0.093	0.085	0.065	0.058
CLas-A 12T	3	0.045	0.081	0.061	0.053	0.048
CLas-S 12T	1	0.060	0.068	0.197	0.058	0.058
CLas-S 12T	2	0.067	0.070	0.207	0.066	0.069
CLas-S 12T	3	0.075	0.072	0.202	0.074	0.080
CTV 12T	1	0.303	0.270	0.295	0.237	0.037
CTV 12T	2	0.331	0.315	0.320	0.249	0.026
CTV 12T	3	0.317	0.292	0.308	0.243	0.048

Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas,  $\pm$  desviación estándar para 6T y 12T de los tres inóculos para *TIB-NBS-LRR*.



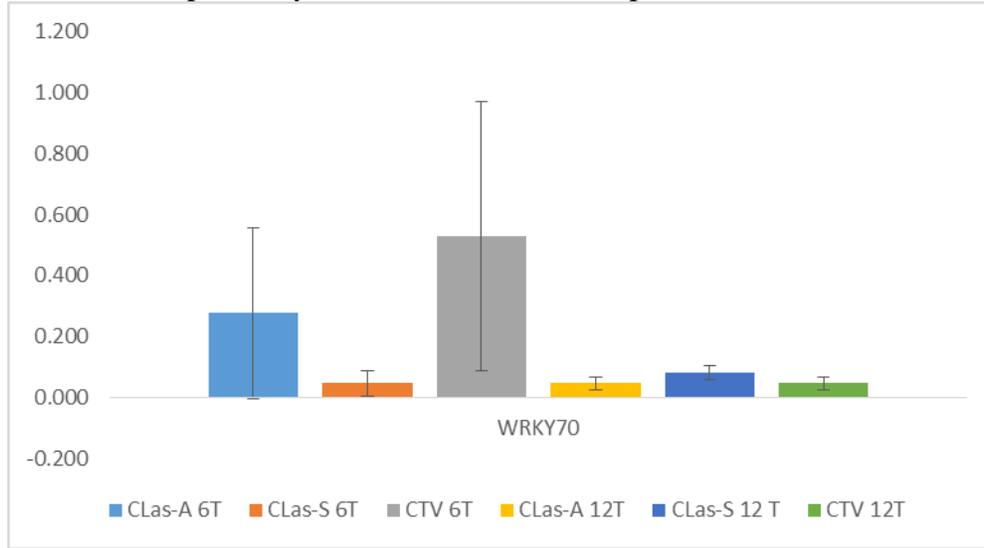
\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas,  $\pm$  desviación estándar para 6T y 12T de los tres inóculos para *NB-ARC*.



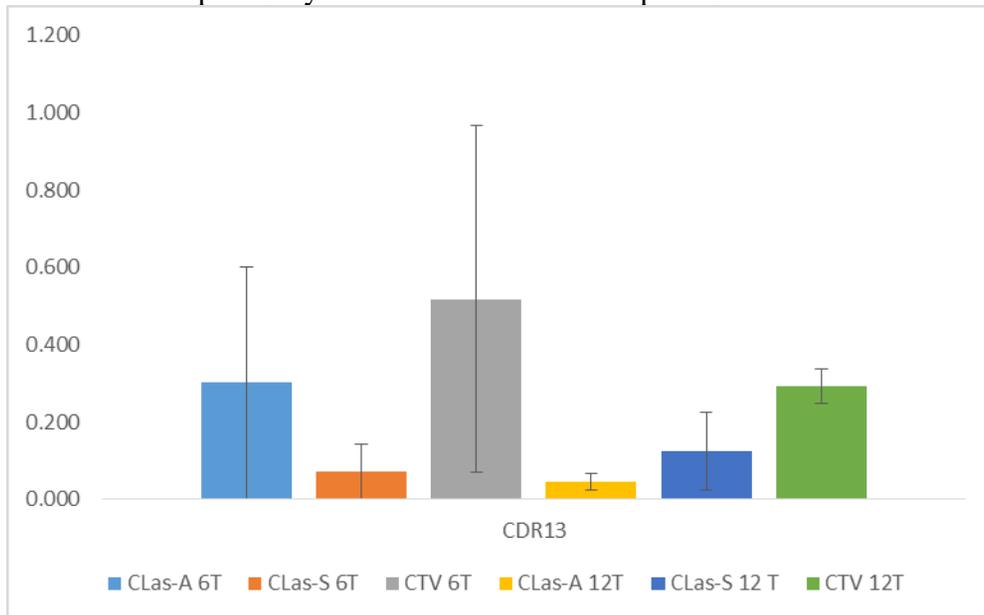
\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas,  $\pm$  desviación estándar para 6T y 12T de los tres inóculos para *WRKY70*.



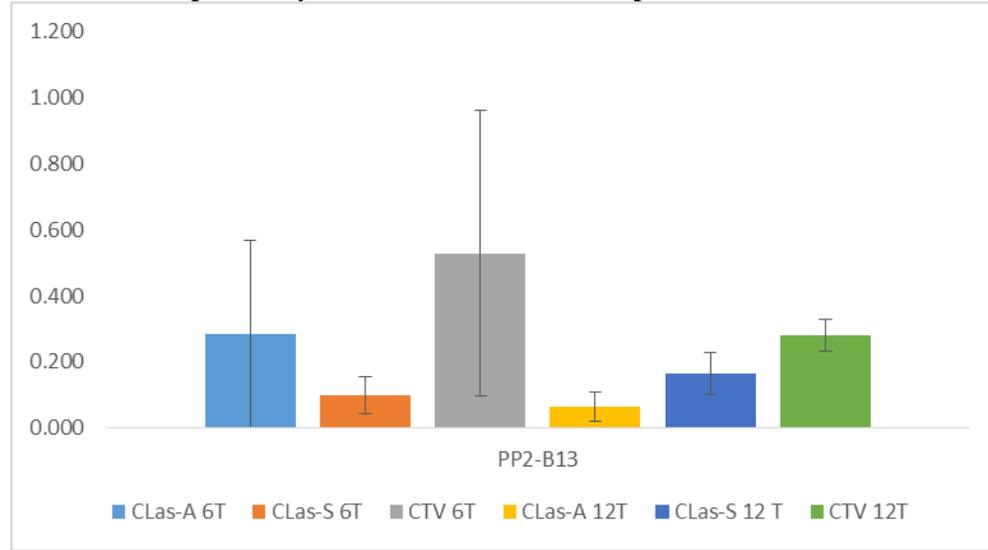
\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas,  $\pm$  desviación estándar para 6T y 12T de los tres inóculos para *CDR13*.



\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Cuantificación Relativa ( $\Delta Cq$ ) promedio de tres repeticiones biológicas,  $\pm$  desviación estándar para 6T y 12T de los tres inóculos para *PP2-B13*.



\*=0.10 \*\*=0.05 \*\*\*=0.001 \*\*\*\*=0.0001

Sintomas de los inoculos de CLas-A, CLas-S, CTV en plantas de Naranja dulce/naranja agrio a los 6 y 12 meses despues del inóculo.

