

Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLAs and CTV

Identificación y clonación de tres genes endógenos que pueden conferir resistencia a patógenos en cítricos incluyendo CLAs y CTV

Pedro Iván Ventura-Medina, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa*, RGP-Fruticultura, ¹Fitopatología, ²RGBP-Semillas, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, CP 56230; Vicente Febres, Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, FL, 32611, USA; ¹Gustavo Mora-Aguilera, ²Alejandrina Robledo-Paz. *Autor para correspondencia: alexge@colpos.mx

Recibido: 30 de Junio, 2019.

Aceptado: 16 de Agosto, 2019.

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.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1906-6

Primera publicación DOI: 05 de Septiembre, 2019.

First DOI publication: September 05, 2019.

Resumen. *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLAs), agente causal del huanglongbing (HLB), y el *Citrus tristeza virus* (CTV) constituyen amenazas para la citricultura mexicana por su condición endémica en cítricos agrios de algunas regiones del pacífico y de focos recientes de razas severas, respectivamente. La identificación y clonación de genes relacionados con la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) de la planta podrían coadyuvar como parte de una estrategia de manejo integrado. Este

Abstract. *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLAs), causal agent of Huanglongbing disease (HLB), and the *Citrus tristeza virus* (CTV) constitute a serious threat to Mexican citriculture because its endemic status in limes in several regions of the Pacific coast and also for the recent detection of severe strains, respectively. The identification and cloning of some genes related to the Systemic Acquired Resistance (SAR) of the plant could help to confront the diseases as an integrated management strategy. This work had the objective of cloning specific genes inherent to the plant as a first step to obtain transgenic citrus plants putatively resistant to CLAs. The genes were selected based on the response of citrus plants to a wide range of pathogens, they were; a regulating gene for salicylic acid signaling (SA) as the inducer gen Azelaic Acid Induced 1 (*AZI-1*), a Citrus Non-Race-Specific Disease Resistance 1 (*CsNDR-1*) and a pathogenesis related protein 1 gen (*PR-1*). These three genes (*AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1*)

trabajo tuvo como objetivo desarrollar construcciones con genes específicos inherentes a la planta como primera etapa en la generación de plantas transgénicas resistentes a CLas. Los genes seleccionados con base a la respuesta de cítricos a una amplia gama de patógenos, fueron *AZI-1*, 1-inductor del ácido 'Azelaic' y *CsNDR-1*, 1-resistencia no específica a enfermedades en cítricos, ambos genes reguladores de la señalización del ácido salicílico (SA), y el gen asociado con la síntesis de proteína 1 relacionada con la patogenicidad (*PR-1*). Los tres genes (*AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*) se insertaron independientemente en pUC118-FMV-Poly-2-1. Posteriormente estos tres genes fueron subclonados individualmente en el vector pCAMBIA 2301, mientras que en pCAMBIA 2201 se clonó el gen *AZI-1*. La clonación de los genes en los vectores pCAMBIA2301 y pCAMBIA2201 permitió incorporar a las construcciones un gen de selección de transformación (35S-nptII-35S) y un gen reportero (35S-GUS-NOS). La construcción *CsNDR-1* fue clonada en las cepas EHA5 y AgL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Los genes *AZI-1* y *PR-1* no se lograron integrar a estas cepas de *Agrobacterium*. Estas construcciones representan el primer paso para generar cítricos transgénicos como una alternativa para enfrentar a CLas y CTV.

Palabras clave: RSA, plásmidos, *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*.

El CTV es subendémico en México con un reciente brote de raza severa en algunos municipios del Golfo de México. Es un organismo reglamentado por el área oficial desde los 80's prevaleciendo en condición asintomática. Por el contrario, el huanglongbing (HLB) o dragón amarillo también llamado citrus greening o enverdecimiento de los cítricos se detectó en 2009 con rápida dispersión en el país. Esta es una enfermedad causada por una

were independently inserted into pUC118-FMV-Poly-2-1, subsequently they were subcloned individually into the vector pCAMBIA 2301 while gene *AZI-1* was only cloned into pCAMBIA 2201. The *CsNDR-1* construct was cloned into *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA5 and AgL1 while genes *AZI-1* and *PR-1* could not be inserted into these strains of *Agrobacterium*. These constructions are the first step to be able to generate transgenic citrus as an alternative to face the HLB.

Keywords: SAR, plasmids, *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1*.

The CTV is a subendemic pathogen in Mexico and a recent outbreak of a severe race has been detected in some municipalities of the Gulf of Mexico. The *Citrus tristeza virus* is an organism regulated by the official division since the 1980s but has remained symptomless. Conversely, Huanglongbing (HLB) or yellow dragon, also known as citrus greening (*enverdecimiento de los cítricos*), was detected in 2009 and spread rapidly in Mexico. Huanglongbing is a disease caused by a Gram-negative *Candidatus liberibacter* bacterium (Gottwald, 2007). Three species are known: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) and *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam); *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) is the only one reported in Mexico. CLas attacks all citrus, affects the productive physiology of young and adult plants, including hybrids, by producing moderate-to-severe symptoms and is distributed in almost all the citrus producing countries (Bové, 2012; Hall *et al.*, 2012). This systemic bacterium multiplies and is transported by the phloem and requires insect vectors to spread the disease, the most important being *Diaphorina citri* (Hall *et al.*, 2012; Ichinose *et al.*, 2010).

bacteria Gram-negativa *Candidatus liberibacter* (Gottwald, 2007). Se conocen tres especies: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), siendo la primera la única reportada en México. CLas ataca a todos los cítricos, afecta la fisiología productiva de las plantas jóvenes y adultas con síntomas moderado a severos, incluyendo a los híbridos, y está distribuida en casi todos los países productores de cítricos (Bové, 2012; Hall *et al.*, 2012). La bacteria sistémica se multiplica y transporta por el floema requiriendo de insectos vectores para su transmisión, siendo *Diaphorina citri* más importante (Hall *et al.*, 2012; Ichinose *et al.*, 2010).

Mora-Aguilera *et al.* (2014) reportan niveles de intensidad epidémica variable con incidencia del 26% en Brasil hasta 100% en China. Los mismos autores reportan el potencial de pérdidas productivas en 42% para naranja dulce, 62% en limón mexicano y 17.3% en limón persa bajo las condiciones citricolas de México. Por el carácter epidémico de la enfermedad, el gobierno federal ha impulsado desde 2008 un programa nacional de control basado en la erradicación de plantas enfermas, control del vector y uso de material certificado, el cual ha permitido contener el impacto de la enfermedad, reconociéndose regiones endémicas y subendémicas como Colima, Michoacán y Nayarit. Actualmente no existen variedades resistentes por lo que el control del vector y un manejo agronómico eficiente con énfasis en la nutrición y riego permite mantener la rentabilidad de plantaciones comerciales (Mora-Aguilera, G. 2018. Datos no publicados; Fu *et al.*, 2016). Existen a nivel experimental diversas alternativas físicas y químicas para el control de CLas (Zhang *et al.*, 2014; Vazquez-Garcia *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2008). Algunos de estos métodos no han tenido resultados consistentes, y

Mora-Aguilera *et al.* (2014) reported a variable level of epidemic intensity with 26% incidence in Brazil and up to 100% in China. The same authors reported it could cause production losses of 42% in sweet orange, 62% in Mexican lemon and 17.3% in Persian lime under the citrus production conditions in Mexico. Due to the epidemic character of the disease, since 2008 the Mexican government has supported a national program for controlling the disease based on eradicating infected plants, controlling the vector and using certified materials, which has made it possible to control the disease impact and identify endemic and subendemic regions such as Colima, Michoacán and Nayarit. Since no resistant varieties are currently available, measures for controlling the vector and an effective agronomic management with special attention on nutrition and irrigation have made it possible to maintain profitability in commercial plantations (Mora-Aguilera, G. 2018. Data not published; Fu *et al.*, 2016). At the experimental level, there are several physical and chemical alternatives for controlling CLas (Zhang *et al.*, 2014; Vazquez-Garcia *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2008). Some of these methods have not produced consistent results, and others, including the use of antibiotics, are not environmentally or economically viable. The development of transgenic citrus varieties as an alternative for rapidly developing resistance has proven to be viable against CTV, but the use of genes exogenous to the plant has limited its commercial implementation. One alternative is to use CRISPR, a gene editing technique that is still being developed, and endogenous genes associated with plant defense mechanisms.

The activation of these mechanisms starts by recognizing effectors such as flagelin, chitins, glucoproteins and lipopolysaccharides known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).

otros, como el uso de antibióticos, no son viables ambiental y económicamente. El desarrollo de variedades transgénicas en cítricos, como una alternativa para el rápido desarrollo de resistencia, ha demostrado su viabilidad contra el CTV; sin embargo, el empleo de genes exógenos a la planta ha limitado su implementación comercial. Una alternativa es el empleo de CRISPR, técnica de edición de genes aun en desarrollo, y el uso de genes endógenos asociados a mecanismos de defensa en plantas.

La activación de estos mecanismos comienza con el reconocimiento de efectores como flagelina, quitinas, glucoproteínas y lipopolisacáridos que se denominan Patrones Moleculares Generales Asociados a Patógenos (PMGAP). Las proteínas que reconocen a estos efectores son llamadas Proteínas de Resistencia (R). Este mecanismo de respuesta específica se denomina resistencia gen por gen *sensu* Flor (Gao *et al.*, 2015; Nishimura y Dangl 2010; Belkhadir *et al.*, 2004). Al tipo de resistencia ejercida por proteínas R, únicamente en presencia de un patógeno, se denomina resistencia sistémica adquirida (RSA) (Gómez y Mejía, 2011).

Recientemente, el análisis del transcriptoma de cítricos en respuesta a la infección de CLas, CLam y CTV ha demostrado que varios genes se sobreexpresan en respuesta a la infección mientras que otros genes se reprimen (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). Entre los múltiples genes consistentemente asociados con la RSA se incluyen *CsNDR-1*, *AZI-1* y *PR-1* expresados en respuesta a fitopatógenos de cítricos y otros cultivos (Hu *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2013; Pajerowska *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Van Loon y Van Strien, 1999). La identificación de genes activados por la presencia de fitopatógenos permite postular la posibilidad de garantizar su expresión en la planta en forma continua y regular mediante ingeniería genética con el fin de anticipar procesos de infección. Este trabajo

The proteins that recognize these effectors are known as resistance proteins (R). This specific response mechanism is called gene-for-gene resistance *sensu* Flor (Gao *et al.*, 2015; Nishimura and Dangl 2010; Belkhadir *et al.*, 2004). The type of resistance conferred by R proteins only in the presence of a pathogen, is called systemic acquired resistance (SAR) (Gómez and Mejía, 2011).

Recently, analyses of citrus transcriptome in response to CLas, CLam and CTV infection have demonstrated that several genes are overexpressed in response to infection, while others are restrained (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). The multiple genes consistently associated with RSA include *CsNDR-1*, *AZI-1* and *PR-1*, which are expressed in response to phytopathogens of citrus and other crops (Hu *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2013; Pajerowska *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Van Loon and Van Strien, 1999). Genes activated by the presence of phytopathogens have been identified, which offers the possibility of ensuring the continuous and regular expression of those genes in the plant through genetic engineering in order to avoid infection processes. Therefore, the objective of this study was to identify and isolate *CsNDR-1*, *AZI-1* and *PR-1* using genetic engineering, clone them in transformation vectors and introduce them into two *Agrobacterium tumefaciens* strains for future implementation in citrus genetic transformation using endogenous genes in order to induce resistance to CLas and CTV.

MATERIALS AND METHODS

Biological material. Plants of *Arabidopsis thaliana* and sweet orange (*Citrus sinensis*) were grown in a mixture of peat moss-perlite substrate (60:40) under

tuvo como propósito identificar y aislar los genes *CsNDR-1*, *AZI-1* y *PR-1* a través de ingeniería genética, clonarlos en vectores de transformación e introducirlos en dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para su implementación futura en transformación genética de cítricos con genes endógenos para inducir la resistencia a CLas y CTV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* y de naranja dulce (*Citrus sinensis*) fueron crecidas en una mezcla de sustrato peat moss-perlita (60:40) en condiciones de invernadero a una temperatura de 27-30 °C y 2243 m.s.n.m. en Montecillo Texcoco, Estado de México.

Análisis bio-informático. Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) para buscar las secuencias consenso de la base de datos de *Arabidopsis* (Pajerowska M.K. *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) y de *C. sinensis* (Lu *et al.*, 2013); se eligió la secuencia con mayor similaridad (Query). Para el análisis de alineamiento de las secuencias conservadas de los genes reportados se utilizó el programa Mega6. Los cebadores diseñados se analizaron con los programas Oligo Analyzer tool, Primer Questo Tool (IDT, Integrated DNA Technologies) y con NEBcutter (BioLabs) para analizar la posible formación de dímeros e identificar los sitios de restricción en los cebadores.

Extracción de ADN. La extracción de ADN para el aislamiento de los genes *AZI-1* y *PR-1*, se llevó a cabo usando 0.1 gramos de hojas maduras de *A. thaliana* siguiendo el método de CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987). Mientras que para el aislamiento de *CsNDR-1* se emplearon hojas jóvenes de *C. sinensis* usando el QIAGEN DNAeasy kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de

greenhouse conditions at 27-30 °C temperature and 2243 masl, in Montecillo, Texcoco, State of Mexico.

Bioinformatic analysis. The consensus sequences in the *Arabidopsis* (Pajerowska M.K. *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) and *C. sinensis* database (Lu *et al.*, 2013) were found using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) program, and the sequence with the highest similarity (Query) was selected. The analysis of alignment of the conserved sequences of the reported genes was conducted using the Mega6 program. The designed primers were analyzed using the Oligo Analyzer Tool and Primer Questo Tool (IDT, Integrated DNA Technologies) programs, and NEBcutter (BioLabs) was used to detect the possible formation of dimers and identify the restriction sites in the primers.

DNA extraction. To extract DNA from the *AZI-1* and *PR-1* gene isolates, 0.1 gram of mature *A. thaliana* leaves was used following the method of 2% CTAB (Doyle and Doyle, 1987). To extract DNA from the *CsNDR-1* isolate, young leaves of *C. sinensis* and the QIAGEN DNAeasy kit were used following the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured using 1 µL of the sample in a Nanodrop (Thermo SCIENTIFIC, NANODROP 2000).

Design of primers. The gene search was conducted using BLAST. For the *CsNDR-1* gene the following sequence was found: gi|568842565|ref|XM_006475151.1| PREDICTED: *Citrus sinensis* protein *CsNDR-1*-like (LOC102630232), mRNA. Based on the sequence found, one 'Forward' primer and one 'Reverse' primer were designed, both containing a series of 6 A/T followed by the sequence of the restriction enzyme selected for cloning plus the Kozac ACC sequence, and, finally, the primer sequence.

ADN se midió con 1 µL de la muestra en un nanodrop (Thermo SCIENTIFIC, NANODROP 2000).

Diseño de iniciadores. Se realizó la búsqueda de los genes en BLAST. Para el gen *CsNDR-1* se ubicó la secuencia gi|568842565|ref|XM_006475151.1| PREDICTED: *Citrus sinensis* protein *CsNDR-1*-like (LOC102630232), mRNA. Con la secuencia encontrada se diseñó un iniciador 'Forward' y uno 'Reverse' ambos conteniendo una serie de 6 A/T seguida de la secuencia de la enzima de restricción elegida para la clonación más la secuencia Kozac ACC y finalmente la secuencia del iniciador.

Para el caso del gen *AZI-1* se encontró el siguiente registro gi|30682133|ref|NM_117317.4| *Arabidopsis thaliana* azelaic acid induced 1 (AT4G12470), mRNA y para el *PR-1* gi|17381133|AY064023| *Arabidopsis thaliana* putative pathogenesis-related *PR-1* protein (At2g14610), mRNA. Con las secuencias encontradas se diseñó un iniciador 'Forward' y 'Reverse' para cada gen.

Identificación y Amplificación de genes. La detección y amplificación de los genes por PCR punto final se realizó con cebadores específicos para cada gen incluyendo sitios de restricción para la clonación (Cuadro 1).

En el diseño de los cebadores se incorporaron sitios de restricción de *Apal* (GGGCCC) y *SpeI* (ACTAGT) además de varias adeninas seguidas a esos sitios de restricción. Se usó un volumen final de 25 µL conteniendo 5 µL de ADN, 2.5 µL de 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1 µL de MgCl₂ 50 (Invitrogen), 0.5 µL de dNTPs 10 mM (Promega), 1 µL de cada cebador (10 pmol), H₂O libre de ARNsa/ADNsa (Invitrogen) y 0.2 µL de Taq polimerasa (Invitrogen). Se usó un programa de amplificación de 35 ciclos para *AZI-1* y *PR-1*: 95 °C por 30 s, 68 °C por 30 s y 68 °C por 30 s. Para *CsNDR-1* 35 ciclos: 95 °C por 30 s, 66 °C por 30 s y 68 °C por 40 s. Los tres genes tuvieron una primera etapa de

The following record of the *AZI-1* gene was found: gi|30682133|ref|NM_117317.4| *Arabidopsis thaliana* azelaic acid induced 1 (AT4G12470), mRNA, and for *PR-1* gi|17381133|AY064023| *Arabidopsis thaliana* putative pathogenesis-related *PR-1* protein (At2g14610), mRNA. Based on the sequences found, the 'Forward' and 'Reverse' primers were designed for each gene.

Gene identification and amplification. Gene detection and amplification through end-point PCR was performed using specific primers for each gene, including restriction points for cloning (Table 1).

To design the primers, restriction sites of *Apal* (GGGCCC) and *SpeI* (ACTAGT) were incorporated, as well as several adenines following the restriction sites. For this, we used a final volume of 25 µL of a mixture containing 5 µL of DNA, 2.5 µL of 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1 µL of MgCl₂ 50 (Invitrogen), 0.5 µL of dNTPs 10 mM (Promega), 1 µL of each primer (10 pmol), RNAsa/DNAsa-free H₂O (Invitrogen) and 0.2 µL of Taq polymerase (Invitrogen). The amplification program consisted of 35 cycles for *AZI-1* and *PR-1*: 95 °C for 30 s, 68 °C for 30 s and 68 °C for 30 s. For *CsNDR-1*, 35 cycles: 95 °C for 30 s, 66 °C for 30 s and 68 °C for 40 s. The three genes had an initial pre-denaturation stage at 95 °C for 2 min and a final extension stage at 68 °C for 5 min.

The PCR products were analyzed in 1% agarose gel, with 5 µL of the PCR product and 3 µL of load buffer (Promega). The gel was run at 90 volts, 400 amperes for one hour, and was dyed in ethidium bromide for 5 min. The PCR products that amplified at the expected size were purified using the QIAquick® PCR Purification kit and sequenced to corroborate the isolation of the tested gene before using engineering.

Vector construction. The pUC118-FMV-Poly-2-1 vector (Febres *et al.*, 2003) was grown in

**Cuadro 1. Cebadores diseñados para aislar y clonar los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*.
Table 1. Primers designed to isolate and clone the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes.**

Cebador ^x	Secuencia ^y	Amplicon ^z
<i>AZII</i> F	5' AAAGGGCCCATGGCTTCAAAGAACTCAGCCTCTCTTG-3'	
<i>AZII</i> R	5'-AAA ACTAGTT CAAGCACATTGGAAACCAGATGGAAGC-3'	486pb
<i>PR-1</i> F	5'AAAGGGCCCATGAATTTTACTGGCTATTCTCGATTTTTAA-3'	
<i>PR-1</i> R	5'-AAA ACTAGTT TAGTATGGCTTCTCGTTCACATAATTCC-3'	486pb
<i>CsNDR1</i> F	5'-AAA AAAGGGCCACCATGTCAGAAAACGCCGGTGGGTGCTGC-3'	
<i>CsNDR1</i> R	5'-AAAAAA ACTAGTT TAAAGCAAAAATCAAGACAAAAAATACAAC-3'	618pb

^xNombre de los cebadores F:forward, R: reverse / Name of the primers: F:forward, R: reverse.

^ySecuencia de cada cebador empleado / Sequence of each primer used.

^ztamaño del amplicon a obtener para cada gen / Size of the amplicon to obtain each gene.

predesnaturalización de 95 °C por 2 min y una etapa final de extensión de 68 °C durante 5 min.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%, con 5 µL de producto de PCR y 3 µL de Buffer de carga (Promega). El gel se corrió a 90 Volts, 400 Amperios, durante una hora, dejando teñir en bromuro de etidio por 5 min. Los productos de PCR que amplificaron del tamaño esperado se purificaron con QIAquick® PCR Purification Kit y fueron secuenciados para corroborar el aislamiento del gen en cuestión antes de continuar con la ingeniería.

Contrucción del vector. El vector pUC118-FMV-Poly-2-1 (Febres *et al.*, 2003) fue crecido en tres mililitros de medio líquido 2xYT (extracto de levadura 10 g L, triptone 16 g L, NaCl 5 g L) conteniendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina (amp) a 37 °C por 12 h para después aislar el plásmido con el QIAprep®Spin miniprep kit siguiendo las indicaciones del fabricante. Los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* purificados y el vector pUC118-FMV-Poly-2-1 aislado fueron digeridos con las enzimas de restricción *Apal* y *SpeI* a la temperatura y tiempo recomendado para cada enzima. La doble digestión de los tres genes y del vector pUC118-FMV-Poly-2-1 producen un solo fragmento por lo que se

three millimeters of 2xYT liquid culture medium (yeast extract 10 g L, tryptone 16 g L, NaCl 5 g L) containing 100 µg mL⁻¹ of ampicillin (amp) at 37 °C for 12 h and then the plasmid was isolated using the QIAprep®Spin miniprep kit, following the manufacturer's instructions. The purified *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes, as well as the pUC118-FMV-Poly-2-1 isolated vector, were digested with *Apal* and *SpeI* restriction enzymes at the temperature and time recommended for each enzyme. The double digestion of the three genes and vector pUC118-FMV-Poly-2-1 produce a single fragment, so they were purified using a QIAquick® PCR Purification kit, and then ligated for 12 h at 4 °C. The digestion products were cloned in *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) using 80 to 100 ng µL⁻¹ of DNA by electroporation under one pulse conditions at 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). The bacteria that were supposedly transformed were sown in a 2xYT solid culture medium containing 100 µg mL⁻¹ of amp; three aliquots of transformed cells (10, 20 and 50 µL) were tested using a sterile microinjector to distribute them on the medium surface. After 12 h at 37 °C, several individual colonies formed and were analyzed using PCR with the previously mentioned primers in order to corroborate the presence of the genes.

purificaron con el QIAquick® PCR Purification Kit para posteriormente ser ligados durante 12 h a 4 °C. Los productos de la digestión fueron clonados en *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) con 80 a 100 ng μL^{-1} de ADN por electroporación bajo condiciones de un pulso a 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). Las bacterias presuntamente transformadas fueron sembradas en medio sólido 2xYT conteniendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de amp probando tres alícuotas de células transformadas (10, 20 y 50 μl) empleando una micropunta estéril y distribuyendo en la superficie del medio. Transcurridas 12 h a 37 °C varias colonias individuales crecidas fueron analizadas mediante PCR con los cebadores antes mencionados para corroborar la presencia de los genes. Los productos de PCR se corrieron en un gel con 0.8% de agarosa a 100 volts por 30 min.

Las colonias identificadas positivas se crecieron en tres ml de medio líquido 2xYT conteniendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de amp a 37 °C a 230 rpm durante 12 h. Con la mitad del cultivo bacteriano crecido (1.5 mL) se realizó la extracción del plásmido con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN y se mandó a secuenciar para verificar las secuencias de los tres genes. Con la otra mitad de los cultivos bacterianos se hicieron 'stocks' con glicerol y se almacenaron a -80 °C.

Para continuar con la inserción de los genes de interés ahora en plásmidos vectores de transformación pCAMBIA se procedió como sigue: las bacterias con los tres genes contenidos independientemente en pUC118-FMV-Poly-2-1 fueron crecidas en medio sólido 2xYT con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina mientras que aquellas que contenían los plásmidos pCAMBIA2201 y pCAMBIA 2301 se crecieron en medio sólido 2xYT con 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol (Cap) o 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina (Kan) respectivamente por 12 h a 37 °C. Los plásmidos fueron extraídos con el QIAprep® Spin Miniprep Kit y fueron subsecuentemente digeridos con las

The PCR products were run in 0.8% agarose gel at 100 volts for 30 min.

The positive colonies were sown in three ml of 2xYT liquid culture medium containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of amp at 37 °C at 230 rpm for 12 h. Using half of the bacterial culture that had grown (1.5 ml), the plasmid was extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit from QIAGEN and sent out for sequencing to verify the sequences of the three genes. With the other half of the bacterial cultures, "stocks" were prepared using glycerol and then stored at -80 °C.

To continue inserting the genes of interest now into pCAMBIA transformation vector plasmids, the following procedure was used: the bacteria with the three genes independently contained in pUC118-FMV-Poly-2-1 were grown in 2xYT solid culture medium with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ampicillin, while those containing the pCAMBIA2201 and pCAMBIA 2301 plasmids were grown in solid 2xYT culture medium with 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of chloramphenicol (Cap) or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of kanamycin (Kan), respectively, for 12 h at 37 °C. The plasmids were extracted with a QIAprep® Spin Miniprep kit and then digested with *Bam*HI and *Sph*I restriction enzymes at the temperature and time recommended for each enzyme. The double digestion products of pUC118-FMV-Poly-2-1 were purified using the QIAgen gel purification kit, while the double digestion products of the pCAMBIA vectors were purified using the QIAprep Miniprep kit. Product ligation was carried out by incubating them at 4 °C for 12 h. The digestion products were cloned in *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) using 80 to 100 ng μL^{-1} of DNA by electroporation under one pulse conditions at 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). The bacteria that were supposedly transformed were sown in 2xYT solid culture medium containing 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Cap for pCAMBIA2201, or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Kan for pCAMBIA 2301; three aliquots of

enzimas de restricción *Bam*HI y *Sph*I a la temperatura y tiempo recomendado para cada enzima. Los productos de la doble digestión de pUC118-FMV-Poly-2-1 fueron purificados usando el QIAgen gel purification kit en tanto que los productos de la doble digestión de los vectores pCAMBIA fueron purificados con el Qiaprep Miniprep Kit. La ligación de los productos se realizó incubándolos durante 12 h a 4 °C. Los productos de la digestión fueron clonados en *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) con 80 a 100ng/ μ l de ADN por electroporación bajo condiciones de un pulso a 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). Las bacterias presuntamente transformadas fueron sembradas en medio sólido 2xYT conteniendo 25 μ g mL⁻¹ de Cap para pCAMBIA2201 o 50 μ g mL⁻¹ de Kan en el caso de pCAMBIA 2301 probando tres alícuotas de células transformadas (10, 20 y 50 μ L) empleando una micropunta estéril y distribuyendo en la superficie del medio. Transcurridas 12 h a 37 °C varias colonias individuales crecidas fueron analizadas mediante PCR con los cebadores específicos para corroborar la presencia de cada uno de los tres genes.

Una vez más las colonias individuales que resultaron positivas se crecieron en medio líquido con los antibióticos respectivos para cada plásmido durante a 37 °C a 230 rpm por 12 h. De igual manera, una alícuota se mandó a secuenciar y con la otra alícuota de bacterias se hicieron ‘stocks’ para almacenar a -80 °C.

Transformación de *A. tumefaciens*. Los plásmidos pCAMBIA con las construcciones fueron crecidos en medio sólido 2xYT conteniendo 25 μ g mL⁻¹ de Cap para pCAMBIA2201 o 50 μ g mL⁻¹ de Kan en el caso de pCAMBIA 2301 a 37 °C por 12 h, transcurrido este tiempo los plásmidos se extrajeron con el Qiaprep Spin miniprep kit. Las cepas competentes de *A. tumefaciens* EHA 105 y AGL 1 (Kayim y Koc 2005; Almeida *et al.*, 2003)

transformed cells (10, 20 and 50 μ L) were tested using a sterile microinjector to distribute them on the medium surface. After 12 h at 37 °C, several individual colonies formed and were analyzed through PCR using the specific primers in order to corroborate the presence of each of the three genes. Once more, the positive colonies were individually grown in a liquid culture medium containing the corresponding antibiotics for each plasmid at 37 °C at 230 rpm for 12 h. Similarly, one aliquot was sent out for sequencing, and the other aliquot of bacteria was used to prepare “stocks” that were stored at -80 °C.

Transformation of *A. tumefaciens*. The pCAMBIA plasmids with the constructions were grown in 2xYT solid culture medium containing 25 μ g mL⁻¹ of Cap for pCAMBIA2201, or 50 μ g mL⁻¹ of Kan for pCAMBIA 2301 at 37 °C for 12 h, and then the plasmids were extracted using the Qiaprep Spin miniprep kit. The competent EHA 105 and AGL 1 strains of *A. tumefaciens* (Kayim and Koc 2005; Almeida *et al.*, 2003) were selected for transformation through electroporation (Bio-Rad, 165-2100) under one pulse conditions at 2.5 kV (Bio-Rad, 165-2100). The bacterial cells of the EHA 105 strain that were supposedly transformed were grown in solid YEP culture medium (10 g L of bactopectone, NaCl 5 g L, yeast extract 10 g L) with rifampicin (Rif) (50 μ g mL⁻¹) and Kan (50 μ g mL⁻¹), while the cells of the AGL 1 strain were grown in solid YEP culture medium with Rif (50 μ g mL⁻¹), Kan (50 μ g mL⁻¹) and carbenicillin (Carb) (25 μ g mL⁻¹). Aliquots of 50, 100 and 200 μ L of the two *Agrobacterium* strains were tested and incubated for two to three days at 27 °C. The individual colonies that grew were analyzed through end-point PCR using the primers and under the conditions previously described for each gene. The colonies that were positive were sent out for sequencing. The

se eligieron para ser transformadas mediante electroporación (Bio-Rad, 165-2100) bajo las condiciones de un pulso a 2.5 kV (Bio-Rad, 165-2100). Las células bacterianas presuntamente transformadas de la cepa EHA 105 fue crecidas en medio sólido YEP (bactopeptone 10 g L, NaCl 5 g L, extracto de levadura 10 g L) con rifampicina (Rif) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y Kan ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que las células de la cepa AGL 1 fueron crecidas en medio sólido YEP con Rif ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), Kan ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y carbenicilina (Carb) ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se probaron alícuotas de 50, 100 y 200 μL de las dos cepas de *Agrobacterium* y se incubaron durante dos a tres días a 27°C . Las colonias individuales crecidas se analizaron por PCR punto final con los iniciadores y condiciones antes descritos por cada gen, las que resultaron positivas se mandaron a secuenciar. Aquellas colonias cuya transformación y construcción se verificaron mediante la secuenciación se crecieron en medio YEP líquido con los antibióticos respectivos antes de criopreservarlas a -80°C .

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación de los genes. La concentración de ADN de *Arabidopsis* fue de $478.2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ con un valor de unidades de densidad óptica (D.O.) de 2.04. La concentración de ADN de *C. sinensis* fue de 48.7 y su lectura D.O. fue de 1.7. Los productos de PCR corridos en el gel de agarosa mostraron las bandas del tamaño esperado, de 486 pb correspondiente al gen *AZI-1* y *PR-1* y para el gen *CsNDR-1* se obtuvo una banda de 618 pb (Figura 1). La secuenciación de los productos mostró identidad del 99% al menos.

Clonación de los genes en el plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1. Los genes purificados se insertaron en el vector pUC118-FMV-poly-2-1 (Febres

colonies whose transformation and construction were verified through sequencing were grown in liquid YEP culture medium using the corresponding antibiotics before being cryopreserved at -80°C .

RESULTS AND DISCUSSION

Identifying genes. The concentration of *Arabidopsis* DNA was $478.2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ with a value of optical density (O.D.) units of 2.04. The concentration of *C. sinensis* DNA was 48.7, and its OD reading was 1.7. The PCR products run in agarose gel showed bands of the expected size, that is, 486 pb, corresponding to the *AZI-1* and *PR-1* genes, and for the *CsNDR-1* gene one 618 pb band was obtained (Figure 1). Sequencing of the products showed at least 99% identity.

Cloning genes in the pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid. The purified genes were inserted into the pUC118-FMV-poly-2-1 vector (Febres *et al.*, 2013). Individual *E. coli* colonies that grew were analyzed through PCR to detect the transformed colonies. For the *AZI-1* gene, 18 colonies were analyzed using the *AZI-1 F/AZI-1 R* primers, and three positive colonies were obtained (Figure 2A, lanes 2, 4 and 10). For the *PR-1* gene, 18 colonies were also analyzed using the *PR-1 F/PR-1 R* primers, and six positive colonies were obtained (Figure 2B, lanes 2, 9, 11 to 13, and 16). For the *CsNDR-1* gene, the transformation was done twice, and a total of 35 colonies were analyzed using the *CsNDR-1 F/CsNDR-1 R* primers; two positive colonies were obtained, and one of them appears in lane 12 of Figure 2C. All the colonies that were positive by PCR were sent out for sequencing, and the colony of each of the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes that showed the greatest similarity with the sequence reported in the database of the NCBI GenBank was selected to continue cloning in

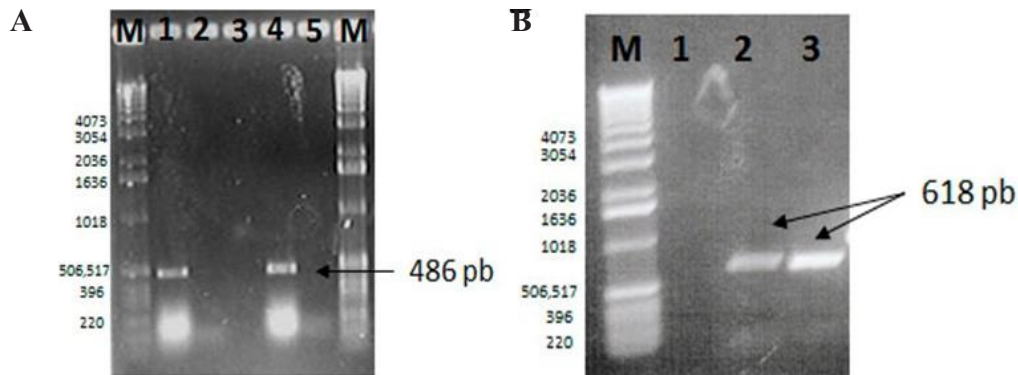


Figura 1. Amplificación de los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*. Geles de agarosa al 1.5 %, con 5 μ l de producto de PCR (carriles 1-2 y 4-5) más 3 μ l de buffer de carga. M; marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). A). Carril 1: amplificación del gen *AZI-1* de *Arabidopsis*. Carril 2: control negativo del gen *AZI-1*. Carril 4: amplificación del gen *PR-1* de *Arabidopsis*. Carril 5: control negativo del gen *PR-1*. B). Carril 1: control negativo de *CsNDR-1*. Carril 2 y 3: amplificación del gen *CsNDR-1*.

Figure 1. Amplification of the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes. 1.5% agarose gels with 5 μ l of PCR product (lanes 1-2 and 4-5) plus 3 μ l of load buffer. M; molecular weight marker (1 kb DNA ladder). A). Lane 1: amplification of the *Arabidopsis AZI-1* gene. Lane 2: negative control of the *AZI-1* gene. Lane 4: amplification of the *Arabidopsis PR-1* gene. Lane 5: negative control of the *PR-1* gene. B). Lane 1: *CsNDR-1* negative control. Lanes 2 and 3: amplification of the *CsNDR-1* gene.

et al., 2013). Las colonias individuales de *E. coli* que crecieron se analizaron por PCR para detectar las transformadas. Para el gen *AZI-1* se analizaron 18 colonias con los iniciadores *AZI-1 F/AZI-1 R*, obteniendo tres colonias positivas (Figura 2A, carriles 2, 4 y 10). Para el gen *PR-1* se analizaron de igual forma 18 colonias con los iniciadores *PR-1 F/PR-1 R*, obteniendo seis colonias positivas (Figura 2B, carriles 2, 9, 11 al 13 y 16). Para el gen *CsNDR-1* se repitió la transformación dos veces y se analizaron un total de 35 colonias con los iniciadores *CsNDR-1 F/CsNDR-1 R*, se obtuvieron dos colonias positivas y se muestra una en el carril 12 de la Figura 2C. Se mandaron a secuenciar todas las colonias que resultaron positivas por PCR y la colonia de cada uno de los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* que mostró la mayor similitud con la secuencia reportada en la base de datos de GenBank de NCBI, se eligió para continuar con la clonación en el vector pUC118-FMV-poly-2-1. Para el caso del gen *PR-1* la colonia tres mostró la mayor similitud (99%), en el caso del gen *AZI-1* la colonia

vector pUC118-FMV-poly-2-1. For the *PR-1* gene, colony three showed the highest level of similarity (99%); in the case of the *AZI-1* gene, colony one showed 99% similarity, and colony 14 showed 99% similarity in the *CsNDR-1* gene. Three constructions were built using the best colonies of each gene inserted between the FMV promoter and the 35S termination signal of pUC118-FMV-Poly-2-1 (Figure 3A, B and C).

The genes isolated in this study (*CsNDR-1*, *AZI-1*, *PR-1*) have been consistently described as possible candidates for generating resistance to several pathogens (Lu *et al.*, 2013). These genes are part of the 633 genes that are altered after inoculation with CLAs, according to Mafra *et al.* (2013), and are associated with the plant's systemic acquired resistance (SAR). Several authors have also identified these genes as part of the plant's response to CLAs and CTV attacks (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016), and, for this reason, they were selected to develop the constructions.

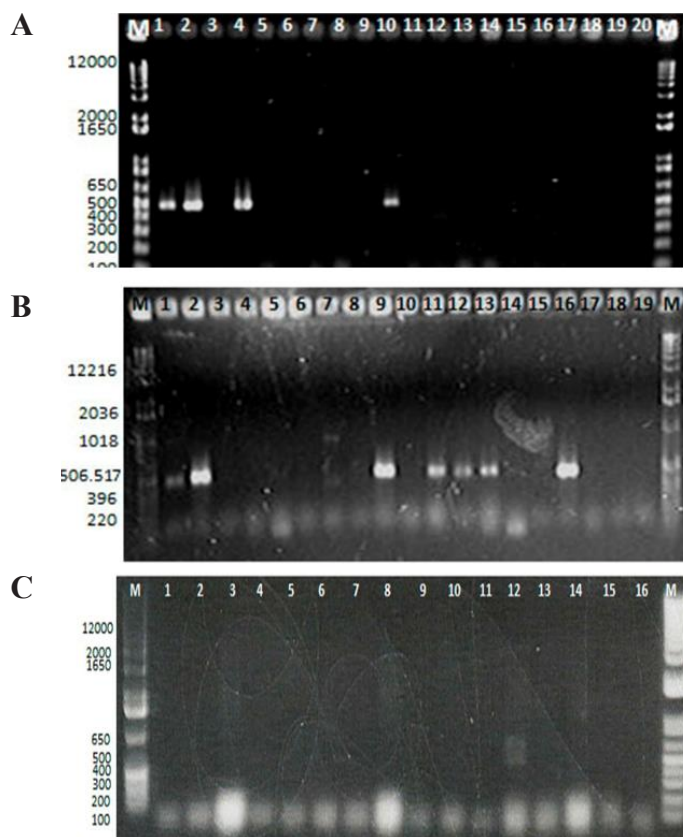


Figura 2. Confirmación mediante PCR de colonias DH5α transformadas con los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* contenidos en el plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1. Fragmentos amplificados en gel de agarosa al 0.8%. M: marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). A). Carril 1: Control positivo del gen *AZI-1*. Carril 2, 4 y 10: Amplificación del gen esperado. Carril 19: control negativo del gen *AZI-1*. B). carril 1: control positivo del gen *PR-1*. Carril 2, 9, 11, 12, 13 y 16; colonias positivas de la amplificación del gen *PR-1*. Carril 19: control negativo del gen *PR-1*. C). Carril 1 al 15, colonias analizadas del gen *CsNDR-1*. Carril 12: muestra positiva. Carril 16; control negativo.

Figure 2. PCR confirmation of DH5α colonies transformed with the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes contained in the pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid. Amplified fragments in 0.8% agarose gel. M: molecular weight marker (1 kb DNA ladder). A). Lane 1: Positive control of the *AZI-1* gene. Lanes 2, 4 and 10: Amplification of the expected gene. Lane 19: negative control of the *AZI-1* gene. B). lane 1: positive control of the *PR-1* gene. Lanes 2, 9, 11, 12, 13 and 16: positive colonies from the amplification of the *PR-1* gene. Lane 19: negative control of the *PR-1* gene. C). Lanes 1-15: *CsNDR-1* gene colonies analyzed. Lane 12: positive sample. Lane 16: negative control.

uno mostró una similaridad del 99% y la colonia 14 fue la que mostró 99% de similaridad en el gen *CsNDR-1*. Se obtuvieron tres construcciones con las mejores colonias de cada uno de los genes insertadas entre el promotor FMV y señal de terminación 35S de pUC118-FMV-Poly-2-1 (Figura 3A, B y C).

Los genes aislados en esta investigación *CsNDR-1*, *AZI-1*, *PR-1* han sido descritos

The pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid was selected because of its small size, and because it produces a large number of copies (500-700). In addition, its multiple cloning site facilitates the integration of DNA fragments within this vector (Febres *et al.*, 2013), and it is also compatible for subsequent cloning within the pCAMBIA vectors incorporating the CaMV35S and/or NOS promoters and terminators of pCAMBIA.

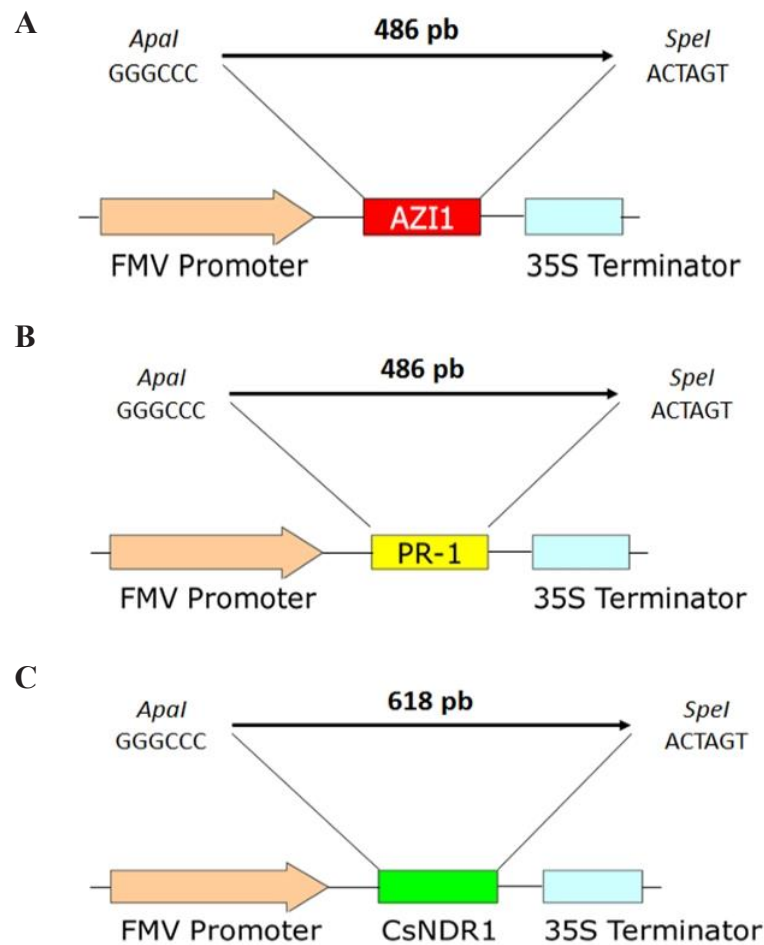


Figura 3. Representación esquemática de las construcciones de los genes insertadas en el plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1. A). *AZI-1*, B). *PR-1* y C). *CsNDR-1*. En la imagen se muestran los genes *AZI-1* (rojo), *PR-1* (amarillo) y *CsNDR-1* (verde) clonados bajo el promotor FMV (anaranjado) y su señal de terminación 35S (azul). En la parte superior de cada construcción se indica el tamaño del amplicón y las enzimas de restricción utilizadas durante la clonación.

Figure 3. Schematic representation of the constructions of the genes inserted into the pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid. A). *AZI-1*, B). *PR-1*, and C). *CsNDR-1*. The image shows the *AZI-1* (red), *PR-1* (yellow) and *CsNDR-1* (green) genes cloned under the FMV promoter (orange) and their 35S termination signal (blue). The upper part of each construction indicates the size of the amplicon and the restriction enzymes used during cloning.

consistentemente como posibles candidatos para generar resistencia a diversos patógenos (Lu *et al.*, 2013). Dichos genes forman parte de los 633 genes que se ven alterados después de la inoculación con CLas de acuerdo con Mafra *et al.*, (2013), los cuales están relacionados con la respuesta sistémica adquirida (RSA) de la planta. Varios autores han identificado también estos genes como parte de la

Cloning in pCAMBIA plasmids. The constructions containing the genes of interest were inserted into vectors pCAMBIA 2201 and 2301. The cloning process was repeated twice, modifying DNA concentrations in the ligation reaction because no transformed colonies with the genes of interest were found. Twenty-one colonies were analyzed in each experiment, for a total of

respuesta de la planta ante el ataque por CLas y CTV (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016), por tal motivo, fueron elegidos para el desarrollo de estas construcciones.

El plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1 fue seleccionado por su tamaño pequeño, por generar un gran número de copias (500 a 700), su sitio múltiple de clonación que permite la fácil integración de los fragmentos de ADN dentro de este vector (Febres *et al.*, 2013); además de ser compatible, para la subsecuente clonación dentro de los vectores pCAMBIA, incorporando los promotores y terminadores CaMV35S y/o NOS de pCAMBIA.

Clonación en plásmidos pCAMBIA. Las construcciones que contenían los genes de interés fueron insertadas en los vectores pCAMBIA 2201 y 2301. El proceso de clonación se repitió por duplicado, modificando las concentraciones de ADN en la reacción de ligación, al no encontrar colonias transformadas con los genes de interés. En cada experimento se analizaron 21 colonias, dando un total de 42 colonias analizadas por cada gen. Para el gen *AZI-1* clonado en pCAMBIA 2201, se modificó la concentración de ADN-plásmido en la reacción de ligación de 31.8 ng μL^{-1} - 108 ng μL^{-1} a 63.6 ng μL^{-1} - 72 ng μL^{-1} ; las colonias crecidas se analizaron por PCR con los iniciadores AZI-1 F/AZI-1 R, obteniendo diez colonias positivas en la segunda repetición de clonación (Figura 4A). El gen *AZI-1* clonado en pCAMBIA 2301 la modificación de la concentración de ADN en la ligación fue de 41.1 ng μL^{-1} - 100 ng μL^{-1} a 82.2 ng μL^{-1} - 86.4 ng μL^{-1} ; de igual forma se analizaron por PCR las colonias crecidas con los mismos iniciadores AZI-1 F/AZI-1 R, se obtuvieron cuatro colonias positivas en el segundo experimento (Figura 4B). En cuanto al gen *PR-1* clonado en el vector pCAMBIA 2301, la concentración del ADN modificado en la ligación fue de 25.2 ng μL^{-1} - 86.4 ng μL^{-1} a 37.8 ng μL^{-1} - 72 ng

42 colonias analizadas para cada gen. Para el *AZI-1* gene clonado in pCAMBIA 2201, the concentration of DNA-plasmid was modified in the ligation reaction from 31.8 ng μL^{-1} -108 ng μL^{-1} to 63.6 ng μL^{-1} -72 ng μL^{-1} ; the grown colonies were analyzed by PCR using the AZI-1 F/AZI-1 R primers, and 10 positive colonies were obtained from the second cloning replication (Figure 4A). The *AZI-1* gene clonado in pCAMBIA 2301, the DNA concentration in the ligation reaction was from 41.1 ng μL^{-1} -100 ng μL^{-1} to 82.2 ng μL^{-1} -86.4 ng μL^{-1} ; the grown colonies were also analyzed by PCR using the AZI-1 F/AZI-1 R primers, and four positive colonies were obtained from the second experiment (Figure 4B). For the *PR-1* gene clonado in the pCAMBIA 2301 vector, the DNA concentration in the ligation reaction was modified from 25.2 ng μL^{-1} -86.4 ng μL^{-1} to 37.8 ng μL^{-1} -72 ng μL^{-1} , and two hours were added to the incubation step after the electric shock; the grown colonies were analyzed using the PR-1 F/PR-1 R primers, and three positive colonies were obtained in the last experiment (Figure 4C). The constructions amplified a product of 486 pb, as expected. For the *CsNDR-1* gene in pCAMBIA, a single test was carried out; 32 colonies were analyzed and only two positive colonies were obtained (Figure 4D).

All the constructions containing the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes under the FMV promoter and the 35S terminator were cloned between the neomycin fosfotransferasaII (*ntptII*) selection gene that confers resistance to kanamycin and the β -glucuronidasa (*uidA*) reporter gene, known as GUS, of the pCAMBIA 2201 and 2301 plasmids. The *ntptII* transformation selection gene remained with the 35S promoter and terminator, and the GUS reporter gene remained with the 35S promoter and the NOS terminator. The *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes clonado in pCAMBIA 2301 have the *ntptII* gene as the bacterium selection gene (Figure 5A,

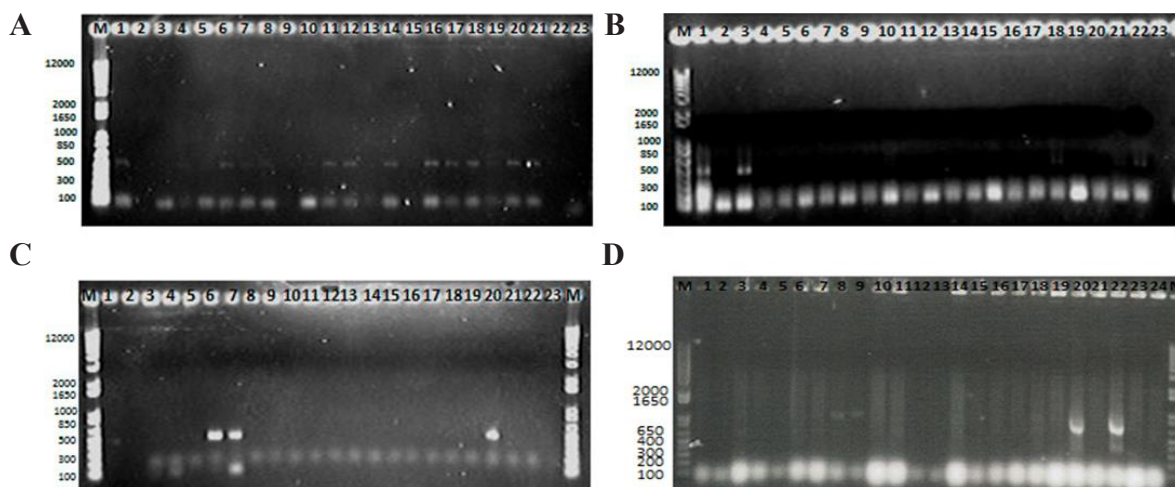


Figura 4. Confirmación mediante PCR de colonias DH5 α con los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* insertados en los plásmidos pCAMBIA 2201 y 2301. Fragmentos amplificados en gel de agarosa al 0.8%. M: marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). A). *AZI-1*-pCAMBIA 2201. Carril 1; Control positivo del gen *AZI-1*. Carril; 4, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16-21; Amplificación del gen esperado. Carril 23; control negativo. B). *AZI-1*-pCAMBIA 2301. Carril 1; Control positivo. Carril; 3, 18, 21 y 22; Amplificación del gen esperado. Carril 23; control negativo. C). *PR-1*-pCAMBIA 2301. Carril 1; control positivo del gen *PR-1*. Carril; 6, 7 y 20; colonias positivas de la amplificación del gen *PR-1*. Carril 23; control negativo. D). *CsNDR-1* en pCAMBIA 2301. Carril 20 y 22; colonias positivas para el gen *CsNDR-1*. Carril 24; control negativo.

Figure 4. PCR confirmation of DH5 α colonies with the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes inserted into the pCAMBIA 2201 and 2301 plasmids. Amplified fragments in 0.8% agarose gel. M: molecular weight marker (1 kb DNA ladder). A). *AZI-1*-pCAMBIA 2201. Lane 1: Positive control of the *AZI-1* gene. Lanes 4, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16-21: amplification of the expected gene. Lane 23: negative control. B). *AZI-1*-pCAMBIA 2301. Lane 1: positive control. Lanes 3, 18, 21 and 22: amplification of the expected gene. Lane 23: negative control. C). *PR-1*-pCAMBIA 2301. Lane 1: positive control of the *PR-1* gene. Lanes 6, 7 and 20: positive colonies from the amplification of the *PR-1* gene. Lane 23: negative control. D). *CsNDR-1* in pCAMBIA 2301. Lanes 20 and 22: positive colonies for the *CsNDR-1* gene. Lane 24: negative control.

μL^{-1} , además de aumentar a dos horas el paso de incubación después del choque eléctrico, las colonias crecidas se analizaron con los iniciadores PR-1 F/ PR-1 R, obteniendo tres colonias positivas en el último experimento (Figura 4C). Las construcciones amplificaron un producto de 486 pb lo cual fue lo esperado. Para el gen *CsNDR-1* en pCAMBIA, se realizó un solo ensayo, se analizaron 32 colonias, obteniendo sólo dos colonias positivas (Figura 4D). Todas las construcciones que contenían los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* bajo el promotor FMV y el terminador 35S, fueron clonadas entre el gen de selección neomicin fosfotransferasaII (*ntptII*) que confiere resistencia a Kanamicina y el gen reportero

C and D). The *AZI-1* gene inserted in pCAMBIA 2201 is located under the bacterium selection gene to chloramphenicol (Figure 5 B).

The constructions were sent out for sequencing in order to corroborate the identity and orientation of the insertion before being transformed to *A. tumefaciens*; the ones that were at least 99% homologous were selected. Figure 6 shows 100% identity of colony two in the case of the *AZI-1* gene inserted in pCAMBIA2301. The pCAMBIA plasmids are successfully used in the genetic transformation of several plants, including citrus (De Oliveira *et al.*, 2015; Hajeri *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2014).

β -glucoronidasa (*uidA*) conocido como GUS de los plásmidos pCAMBIA 2201 y 2301. El gen de selección de transformación *nptII* quedó con el promotor y terminador 35S y el gen reportero GUS quedó con el promotor 35S y con el terminador NOS. Los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* clonados en pCAMBIA 2301 tienen como gen de selección de la bacteria al gen *nptII* (Figura 5A, C y D). El gen *AZI-1* insertado en pCAMBIA 2201 se encuentra bajo el gen de selección en bacteria a cloranfenicol (Figura 5 B).

Las construcciones se mandaron secuenciar para corroborar la identidad y orientación de la inserción antes de continuar con la transformación en *A. tumefaciens* se eligieron aquellas que mostraron una homología de 99% al menos. En la Figura 6 se muestra el 100% de identidad de la colonia dos para el caso del gen *AZI-1* insertado en pCAMBIA2301. Los plásmidos pCAMBIA se usan con éxito en transformación genética de diversas plantas incluyendo cítricos (De Oliveira *et al.*, 2015; Hajeri *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2014).

Transformación de *A. tumefaciens*. Se hizo transformación de las dos cepas *A. tumefaciens* con los tres genes clonados en pCAMBIA y se analizaron con PCR colonias individuales para confirmar la transformación. La construcción del gen *PR-1* en pCAMBIA2301 en la cepa EHA105 produjo varias colonias individuales (Figura 7A); de igual manera la construcción del gen *CsNDR-1* en pCAMBIA2301 en la cepa Agl1 (Figura 7B). Los resultados de PCR confirmaron colonias positivas para ambos genes sin embargo la verificación mediante secuenciación no mostró alta identidad para el caso de la construcción con el gen *PR-1*. La construcción del gen *CsNDR-1* con el promotor FMV y el terminador 35S clonados en pCAMBIA 2301 logró ser insertada en las dos cepas de *A. tumefaciens* EHA 105 y AGL 1. Se analizaron 11 colonias

Transformation of *A. tumefaciens*. Two *A. tumefaciens* strains were transformed using the three genes cloned in pCAMBIA and then individual colonies were analyzed through PCR to confirm that they have been transformed. The construction of the *PR-1* gene in pCAMBIA2301 in the EHA105 strain developed several individual colonies (Figure 7A), as did the construction of the *CsNDR-1* gene in pCAMBIA2301 in the Ag11 strain (Figure 7B). The PCR results confirmed that there were positive colonies for both genes, but the verification through sequencing did not show a high level of identity in the case of the construction with the *PR-1* gene. The construction of the *CsNDR-1* gene with the FMV promoter and the 35S terminator cloned in pCAMBIA 2301 was successfully inserted into the two *A. tumefaciens* EHA 105 and AGL 1 strains. Eleven colonies were randomly analyzed through PCR using the *CsNDR-1* F/*CsNDR-1* R primers, and one positive colony was obtained in the EHA105 strain (Figure 8A), while four positive colonies were obtained for the AGL1 strain (Figure 8B). The low transformation efficiency of *Agrobacterium* and *E. coli* is somewhat common in gene construction and cloning experiments. Gelvin (2003) mentioned that many factors may be involved, such as the low competence of the bacterial cells, stressed cells, poor quality DNA, low or high DNA concentration during transformation, the conditions during fragment ligation, the conditions during electroporation, the incubation temperature, and the concentration of antibiotics, among others. The *A. tumefaciens* EHA 105 strain has been used in citrus genetic transformation and has produced excellent transformation percentages because of its virulence (Hao *et al.*, 2016; Dutt *et al.*, 2015). The AgL1 strain has also shown a high level of transformation in citrus (Shi *et al.*, 2016; Kayim and Koc 2005).

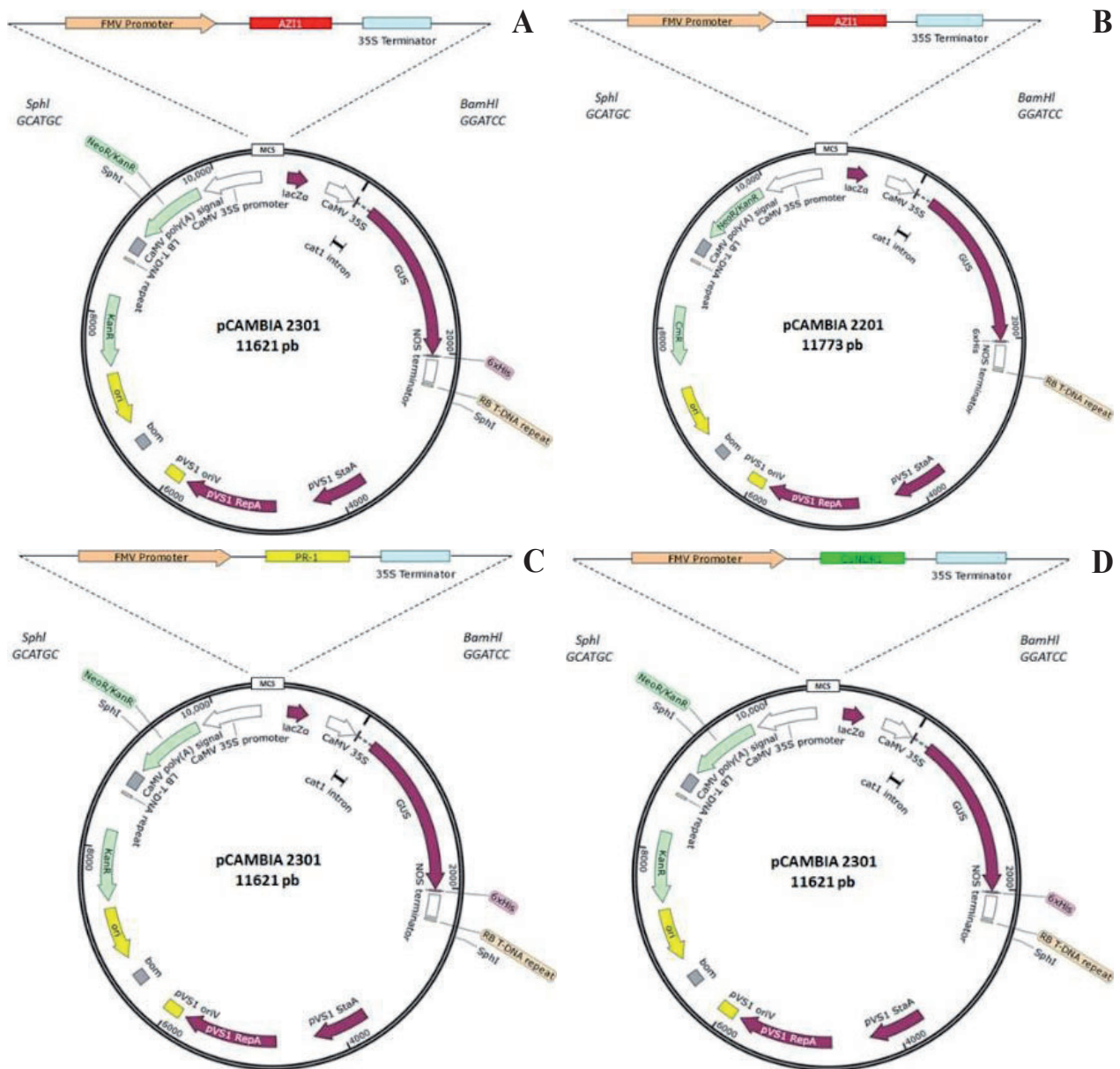


Figura 5. Representación esquemática de la construcción en pCAMBIA 2201 y 2301. Construcción FMV-*AZI-1*-35S insertada en los plásmidos A). pCAMBIA 2301, y B). pCAMBIA 2201. C). Construcción FMV-*PR-1*-35S, y D). Construcción FMV-*CsNDR-1*-35S insertadas en el plásmido pCAMBIA 2301. Los genes de interés, barras de color rojo, amarillo y verde, quedaron insertados entre el gen de selección *ntptII* que confiere resistencia a kanamicina con el promotor y terminador de CaMV (*Cauliflower mosaic caulimovirus*) y entre el gen reportero GUS bajo el promotor 35S del CaMV y terminador Nopalina sintasa (NOS).

Figure 5. Schematic representation of the construction in pCAMBIA 2201 and 2301. FMV-*AZI-1*-35S construction inserted into the plasmids A). pCAMBIA 2301, and B). pCAMBIA 2201. C). FMV-*PR-1*-35S construction, and D). FMV-*CsNDR-1*-35S construction inserted into the pCAMBIA 2301 plasmid. The genes of interest (red, yellow and green bars) were inserted between the *ntptII* selection gene that confers resistance to kanamycin with the CaMV (*Cauliflower mosaic caulimovirus*) promoter and terminator, and the GUS reporter gene under the 35S promoter of CaMV and the nopaline synthase (NOS) terminator.

Arabidopsis thaliana azelaic acid induced 1 (AZI1), mRNA

Sequence ID: [NM_117317.4](#) Length: 865 Number of Matches: 1

Range 1: 176 to 581 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
750 bits(406)	0.0	406/406(100%)	0/406(0%)	Plus/Plus
Query 60	TTGCAACTGCAAGCCAAGTCTTAAACCAAAGCCAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT			119
Sbjct 176	TTGCAACTGCAAGCCAAGTCTTAAACCAAAGCCAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT			235
Query 120	CCAATGTCTCTCCACCCCGTCTTCAAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT			179
Sbjct 236	CCAATGTCTCTCCACCCCGTCTTCAAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT			295
Query 180	TCCACGCACCCCTGGTTCATCCGGAAACAGCTGTCTATTGATGCTCTCAAGCTCGGTGT			239
Sbjct 296	TCCACGCACCCCTGGTTCATCCGGAAACAGCTGTCTATTGATGCTCTCAAGCTCGGTGT			355
Query 240	ATGTGCAAAATGTCTTAAAGCAGTCTACTCAACATCCAGTTGGGACAGCCATCCTCTCAACA			299
Sbjct 356	ATGTGCAAAATGTCTTAAAGCAGTCTACTCAACATCCAGTTGGGACAGCCATCCTCTCAACA			415
Query 300	ATGTTGCTCGCTCATCCAAGGTTTGGTTGACGTCGACGCTGCGATTTGTCTATGCACTGC			359
Sbjct 416	ATGTTGCTCGCTCATCCAAGGTTTGGTTGACGTCGACGCTGCGATTTGTCTATGCACTGC			475
Query 360	TCTGAGGGCTAACGTTCTTGGTATCAACCTTAACGTTCCGATATCTCTCAGCGTTCTTCT			419
Sbjct 476	TCTGAGGGCTAACGTTCTTGGTATCAACCTTAACGTTCCGATATCTCTCAGCGTTCTTCT			535
Query 420	CAACGTTTGTAAACAGAAAGCTTCCATCTGGTTTCCAATGTGCTTGA		465	
Sbjct 536	CAACGTTTGTAAACAGAAAGCTTCCATCTGGTTTCCAATGTGCTTGA		581	

Figura 6. Análisis en GenBank de la secuencia del gen *AZI-1* clonado en pCAMBIA2301. La secuencia Query es el gen reportado de *Arabidopsis thaliana* y la secuencia Sbjct es la clonada en esta investigación con el 100% de similitud. **Figure 6.** Analysis of the *AZI-1* gene cloned in pCAMBIA2301 conducted in the GenBank. The Query sequence is the *Arabidopsis thaliana* reported gene and the Sbjct sequence corresponds to the cloned sequence with 100% similarity obtained in this study.

al azar por PCR con los cebadores CsNDR-1 F/ CsNDR-1 R, obteniendo una colonia positiva en la cepa EHA105 (Figura 8A) mientras que para la cepa AGL1 se obtuvieron cuatro colonias positivas (Figura 8B). La baja eficiencia de transformación de *Agrobacterium* y de *E. coli* es algo común en experimentos de construcción y clonación de genes. Gelvin (2003) menciona que hay muchos factores que pudieran estar involucrados tales como la baja competencia de las células bacterianas, células estresadas, ADN de mala calidad, baja o alta concentración de ADN en la transformación, condiciones durante la ligación de fragmentos, condiciones de electroporación, la temperatura de incubación, concentraciones de antibióticos entre otros. La cepa de *A. tumefaciens* EHA 105 ha sido utilizada

CONCLUSIONS

The *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes were isolated through PCR using the designed primers using the *Arabidopsis thaliana* and *Citrus sinensis* genome that had specific restriction sites for cloning. The isolated and cloned sequences of the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes showed 99% similarity compared to the records of the *A. thaliana* and *C. sinensis* sequences in the NCBI GenBank database. The three genes (*AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1*) were incorporated between the FMV promoter and the 35S CaMV terminator of the pUC118-FMV-poly 2-1 cloning vector. Cloning the genes in the pCAMBIA2301 and pCAMBIA2201 vectors made it possible to incorporate a transformation

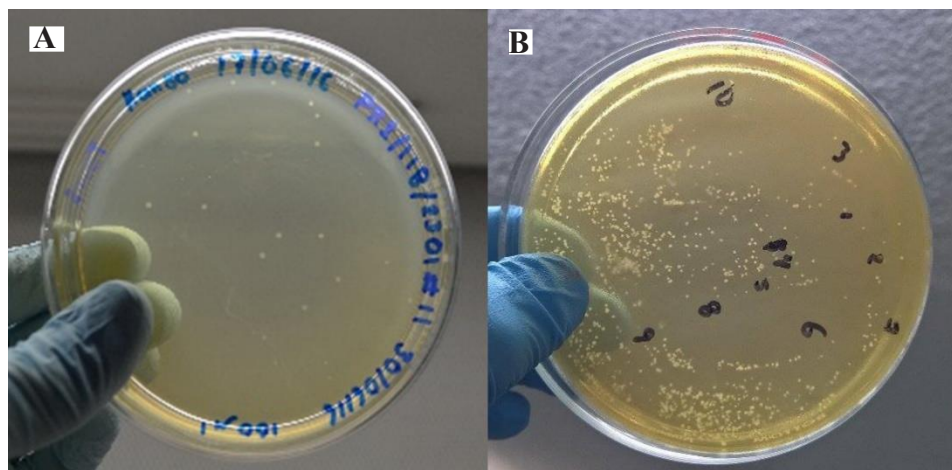


Figura 7. A). Colonias transformadas de *A. tumefaciens* EHA 105 con el plásmido pCAMBIA 2301 con el gen *PR-1* en el medio YEP con Rif (50 µl/ml). B). Colonias transformadas de *A. tumefaciens* Agl1 con el plásmido pCAMBIA 2301 con el gen *CsNDR-1* en el medio YEP con Rif (50 µl/ml), Kan (50 µg/ml) y Carb (25 µg/ml). Los números indican las colonias elegidas al azar para confirmar la presencia del gen mediante PCR.

Figure 7. A). Transformed colonies of *A. tumefaciens* EHA 105 with the pCAMBIA 2301 plasmid with the *PR-1* gene in YEP culture medium with Rif (50 µl/ml). B). Transformed colonies of *A. tumefaciens* Agl1 with the pCAMBIA 2301 plasmid with the *CsNDR-1* gene in YEP culture medium with Rif (50 µl/ml), Kan (50 µg/ml) and Carb (25 µg/ml). The numbers indicate the colonies that were randomly selected to confirm the presence of the gene using PCR.

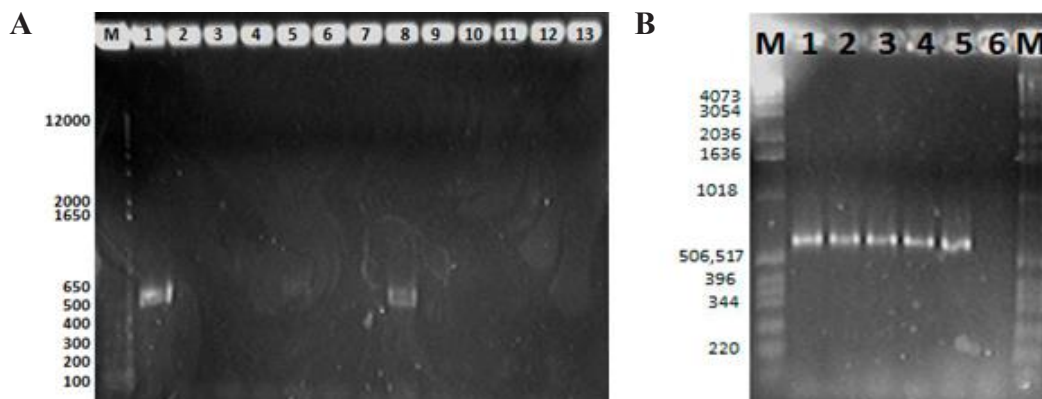


Figura 8. PCR de colonias de *A. tumefaciens*. M: Marcador molecular (1 kb DNA ladder). A). EHA 105 transformadas con el gen *CsNDR-1*. Carril 1: control positivo. Carril; 8 colonia positiva con el gen *CsNDR-1*. Carril 12: control negativo. B). AGL 1 transformada con el gen *CsNDR-1*. Carril 1: control positivo de *CsNDR-1*. Carril 2-5: colonias positivas con el gen *CsNDR-1*. Carril 6: control negativo.

Figure 8. PCR of *A. tumefaciens* colonies. M: Molecular marker (1 kb DNA ladder). A). EHA 105 transformed with the *CsNDR-1* gene. Lane 1: positive control. Lane 8: positive colony with the *CsNDR-1* gene. Lane 12: negative control. B). AGL 1 transformed with the *CsNDR-1* gene. Lane 1: *CsNDR-1* positive control. Lanes 2-5: positive colonies with the *CsNDR-1* gene. Lane 6: negative control.

en transformación genética en cítricos, mostrando excelentes porcentajes de transformación, debido a la virulencia que posee (Hao *et al.*, 2016; Dutt *et al.*, 2015). La cepa AgL1 ha mostrado de igual forma alto grado de transformación de cítricos (Shi *et al.*, 2016; Kayim y Koc 2005).

CONCLUSIONES

Se lograron aislar los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* mediante PCR con los iniciadores diseñados a partir del genoma de *Arabidopsis thaliana* y de *Citrus sinensis* con sitios de restricción específicos para su clonación. Las secuencias aisladas y clonadas de los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* mostraron el 99 % de similitud con respecto a los registros de las secuencias de *A. thaliana* y *C. sinensis* registrada en la base de datos de Genbank de NCBI.

Se incorporaron los tres genes entre el promotor FMV y el terminador 35S CaMV del vector de clonación pUC118-FMV-poly 2-1. La clonación de los genes en los vectores pCAMBIA2301 y pCAMBIA2201 permitió incorporar a las construcciones un gen de selección de transformación (35S-nptII-35S) y un gen reportero (35S-GUS-NOS). Los tres genes (*AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*) se clonaron independiente en pCAMBIA2301 sin embargo sólo el gen *AZI-1* logró clonarse en pCAMBIA2201.

El gen *CsNDR-1* fue incorporado a las cepas *A. tumefaciens* EHA 105 y AgL1. Los genes *AZI-1* y *PR-1* no se lograron integrar a estas cepas de *Agrobacterium*. La identificación, aislamiento y clonación de los genes *CsNDR-1*, *AZI-1* y *PR-1* involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de un patógeno podrían ser sobreexpresados mediante ingeniería genética en cítricos y ser usados para inducir resistencia a varios patógenos incluyendo la bacteria *Candidatus*

selection gene (35S-nptII-35S) and one reporter gene (35S-GUS-NOS) into the constructions. The three genes were then independently cloned into pCAMBIA2301 while gen *AZI-1* was cloned only into pCAMBIA2201.

The *CsNDR-1* gene was incorporated into the *A. tumefaciens* EHA 105 and AgL1 strains. Genes *AZI-1* and *PR-1* could not be integrated into any of the *Agrobacterium* strains. Identifying, isolating and cloning the *CsNDR-1*, *AZI-1* and *PR-1* genes involved in the plants defense mechanisms against a pathogen's attack may be over-expressed through genetic engineering in citrus and used to induce resistance to several pathogens, including the *Candidatus liberibacter* bacterium, the causal agent of HLB and *Citrus tristeza virus*.

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

liberibacter causante de la enfermedad HLB y al *Citrus tristeza virus*.

## LITERATURA CITADA

- Almeida AB, Mourão-Filho AA, Januzzi-Mendes BM, Pavan A. y Martinelli-Rodriguez AP. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. *Scientia Agricola* 60:1: 23-29. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162003000100005>.
- Belkhadir Y, Nimchuk Z, Hubert D, Mackey D and Danglet J. 2004. Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *The Plant Cell*. 16:10: 2822-2835. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024117>
- Bové JM. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Plant Pathology*. 94(3):465-467.
- Da Graca 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>

- De Oliveira MLP, Stover ED and Thomson JG 2015. The *codA* gene as a negative selection marker in *Citrus*. SpringerPlus 4:264: 3-7. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1047-y>
- Ding F, Jin S, Hong N, Zhong Y and Cao Q. 2008. Vitri-fication–cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the citrus Huanglong-bing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. Plant Cell Reports 27(2): 241–250. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0467-8>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin 19: 11-15.
- Dutt M, Barthe G, Irely M and Grosser J. 2015. Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis* NPR-1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). Public Library of Science One. 10:9: 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>
- Febres VJ, Niblet CL, Lee RF and Moore GA. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. Plant Cell Reports 21: 421-428. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0528-y>
- Fu S, Shao J, Zhou Ch, and Hartung JS. 2016. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and two strains of *Citrus Tristeza Virus*. BMC Genomics 17:349 <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>.
- Gao QM, Zhu S, Kachroo P and Kacharoo A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. Frontiers in Plant Science 6: 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gómez S y Mejía Z. 2011. Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 29:2: 154-164. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222864007.pdf>
- Gottwald TR. 2007. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the western hemisphere. Outlooks on PestManagement 18(6):274–279. <https://doi.org/10.1564/18dec09>
- Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO and Gowda S. 2014. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). Journal of Biotechnology 176:20: 42–49. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.010>
- Hall DG, Richardson ML, Ammar El-Desouky and Halbert SE. 2012. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomologia Experimentalis et Applicata. 146: 207–223. [10.1111/eea.12025](https://doi.org/10.1111/eea.12025)
- Hao G, Stover E and Gupta G. 2016. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to Citrus canker and Huanglongbing (HLB). Frontiers in Plant Science 7: 1078: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01078>
- Hoffman MT, Doud MS, Williams L, Zhang M and Ding F. 2012. Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. Phytopathology. 103:15–22. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0138-r>
- Hu Y, Zhong X, Liu X, Lou B, Zhou Ch, and Wang X. 2017. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. Public Library of Science ONE 12(12)e0189229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189229>.
- Ichinose K, Miyazi K, Matsuhira K, Yasuda K, Sadoyama Y, Do HT and Doan VB. 2010. Unreliable pesticide control of the vector psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) for the reduction of microorganism disease transmission. Journal of Environmental Science and Health B. 45:5:466–472. <https://doi.org/10.1080/03601231003800263>
- Pajerowska MK, Emerine DK and Shahid-Mukhtar M. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. Trends in Plant Science. 18:7: 402-4011. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.004>
- Kayim M and Koc NK. 2005. Improved transformation efficiency in Citrus by plasmolysis treatment. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14(1):15-20. <https://doi.org/10.1007/BF03263218>
- Lu H, Zhang C, Albrecht U, Shimizu R, Wang G and Bowman KD. 2013. Overexpression of a citrus NDR1 ortholog increases disease resistance in *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science. 4:157:1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00157>
- 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. 14:247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>.
- Mora-Aguilera G, Robles GP, López AJL, Flores SJ, Acevedo SG, Domínguez MS, Gutiérrez EA and Loeza KE. 2014. Current situation and perspectives in management of citrus HLB. Mexican Journal of Phytopathology 32(2):108-119. <https://doi.org/10.7550/rmb.46314>
- Nishimura MT and Dangl JL. 2010. *Arabidopsis* and the plant immune system. The Plant Journal 61(6): 1053–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04131.x>
- Pinheiro TT, Figueira A and Latado RR. 2014. Early-flowering sweet orange mutant “x11” as a model for functional genomic studies of *Citrus*. BMC Research Notes. 7:511: 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-511>.
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan YP, Bowman KD, Gmitter FGJr, and Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. Horticulture Research 4,17064. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB and Moore GA. 2016. A survey of *FLS2* genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Horticultural Research 3:16022: 1-11. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.22>.
- Van-Loon LC and Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 55. 85–97. <https://doi.org/10.1006/mpmp.1999.0213>

- Vazquez-García M, Velázquez-Monreal J, Medina-Urrutia VM, Cruz-Vargas CD, Sandoval-Salazar M, Virgen-Calleros G and Torres-Moran JP. 2013. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in Central West Mexico. *Southwestern Entomologist*. 38: 579-596. <http://doi.org/10.3958/059.038.0404>
- Yu K, Moreira-Soares J, Kumar-Mandal M, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A and Kachroo P. 2013. A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and *AZI-1* mediates Azelaic-Acid-induced system immunity. *Cell Reports*. 3(4):1266-1278. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.030>
- Zhang M, Guo Y, Powell C, Doud M, Yang C and Duan Y. 2014. Effective antibiotics against '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in HLB-affected Citrus plants identified via the graft-based evaluation. *Public Library of Science One*. 9:11: e111032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111032>
- Zhang M, Powell CA, Guo Y, Doud MS and Duan Y. 2012. A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing huanglongbing-affected citrus plants. *Phytopathology*. 102(6): 567-574. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-11-0265>