



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Gen de control interno VpEf1 α en *Vasconcellea pubescens* (chamburo).
Internal control gene VpEf1 α in *Vasconcellea pubescens* (chamburo).

Tiffany Cevallos-Vilatuña¹, Karen Alejandra Garzón-Salazar¹, Fabio Marcelo Idrovo-Espín^{1,2}

¹Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas/Ingeniería en Biotecnología, Universidad de Las Américas. Quito. Ecuador.

²Facultad de Ciencias Químicas/Química-Bioquímica y Farmacia, Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador.

tiffany.cevallos@udla.edu.ec; karen.garzon.salazar@udla.edu.ec; fmidrovo@uce.edu.ec

Resumen

Los genes conocidos como “housekeeping” controlan o regulan procesos celulares básicos y permanecen activados siempre, independientemente de las condiciones experimentales o entre las células de diferentes tejidos. *Vasconcellea pubescens*, es una especie ampliamente distribuida en América del Sur y pertenece a la familia Caricaceae al igual que la papaya. En primer lugar, se diseñaron primers para el gen EF1 α en base al genoma de *Carica papaya* y *Arabidopsis thaliana*. Después, plántulas de *V. pubescens* se sometieron a tres temperaturas diferentes. La cuantificación de la expresión relativa del gen se realizó por densitometría. Finalmente, los fragmentos obtenidos de la RT-PCR se secuenciaron por Secuenciación Sanger de segunda generación y los análisis bioinformáticos se realizaron con MEGA X mientras que los análisis estadísticos se realizaron con RCommander. Se obtuvo un fragmento de 173 pb que se denominó VpEF1 α . La secuencia de nucleótidos y la traducción a aminoácidos resultaron ser muy similares al compararlos con secuencias Ef1 α conocidas de otras especies vegetales. A partir de la filogenia realizada con la proteína predicha, VpEF1 α se agrupó en un solo clado con secuencias de álamo, cacao y papaya, todas ellas arbóreas, mientras que *Arabidopsis* y tabaco se ubicaron en otro clado. La expresión del gen VpEF1 α fue similar en las tres temperaturas evaluadas cumpliendo el requisito de que no cambie su expresión a diferentes condiciones experimentales. Se describió de esta forma un gen tipo EF1 α en *V. pubescens* (chamburo) que podría ser utilizado como gen control interno o housekeeping en estudios futuros.

Palabras clave: Housekeeping gene, *V. pubescens*, expresión, secuenciación, filogenia.

Abstract

The genes known as "housekeeping" control or regulate basic cellular processes and always remain activated, regardless of experimental conditions or between cells of different tissues. *Vasconcellea pubescens*, a species widely distributed in South America and belongs to the family Caricaceae just like papaya. First, primers for the EF1 α gene were designed on basis of the genome of *Carica papaya* and *Arabidopsis thaliana*. Then, *V. pubescens* seedlings were subjected to three different temperatures. The quantification of the relative expression of the gene was performed by densitometry. Finally, the fragments obtained from RT-PCR were



sequenced by second generation Sanger Sequencing and the bioinformatic analysis were performed with MEGA X while the statistical analysis were performed with RCommander. A 173 bp fragment was obtained which was named VpEF1α. The nucleotide sequence and the translation to amino acids turned out to be very similar when compared to known EF1α sequences from other plant species. From the phylogeny performed with the predicted protein, VpEF1α was grouped in a single clade with sequences of poplar, cocoa and papaya, all of them arboreal, while Arabidopsis and tobacco were located in another clade. The expression of the VpEF1α gene was similar in all the three temperatures evaluated, fulfilling the requirement that it does not change its expression at different experimental conditions. In this way an EF1α type gene was described in *V. pubescens* (chamburo) that could be used as an internal control or housekeeping gene in future studies.

Keywords: Housekeeping gene, *V. pubescens*, expression, sequencing, phylogeny.

Introducción

Los genes de control interno o genes de referencia conocidos como “housekeeping”, controlan y regulan procesos celulares básicos como: el metabolismo primario o el mantenimiento estructural (Luo et al., 2014), debido a esto su nivel de expresión bajo distintas condiciones permanece constante, por lo que se asume que este tipo de genes no se ven afectados por parámetros experimentales o entre células de diferentes tejidos (Zhu et al., 2012). Los genes que cumplen con esta característica son candidatos apropiados para actuar como genes de control interno. Caso contrario, una expresión diferente del gen control bajo diferentes tratamientos, daría lugar a resultados erróneos al compararse con un gen de interés en estudio (Jain et al., 2006; Turabelidze et al., 2010) La identificación de estos genes, incrementa la comprensión de características estructurales de las células, por lo tanto son herramientas fundamentales para estandarizar varias aplicaciones biotecnológicas y estudios genómicos (Eisenberg & Levanon, 2013).

Dependiendo de la especie en estudio y de los tejidos utilizados, los genes de control interno frecuentemente usados en plantas son: Gapdh (del inglés glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Barsalo-

bres-Cavallari et al., 2009), RL5 (que codifica para la proteína L5 de la sub unidad ribosomal 60S), RL28 (que codifica para la proteína L28 de la sub unidad ribosomal 60S), COX1 (del inglés cytochrome C oxidase subunit 1) y β-actina. Sin embargo, la estabilidad y la capacidad de algunos genes mencionados (ACT, GAPDH) han sido cuestionadas en algunos estudios debido a que exhibieron perfiles de expresión variable bajo diferentes condiciones (Suzuki et al., 2000; Tong et al., 2009). Por otro lado, existen estudios puntuales donde indican que el gen EF1α (del inglés Elongation Factor-1α), es un gen de control interno recomendado para la normalización en la expresión espacial y temporal en varios análisis abióticos y bióticos (Li et al., 2010; Løvdal & Lillo, 2009; Zhu et al., 2012). Por lo que se requiere una selección adecuada de genes de referencia en diferentes sistemas biológicos. Se ha reportado en la planta modelo: Arabidopsis thaliana, la presencia de 4 genes que codifican para proteínas EF1α, designadas como A1, A2, A3 y A4 (Axelos et al., 1989). Estas variantes proteicas altamente conservadas cumplen funciones diversas en Arabidopsis, por ejemplo, actúan tanto en la biosíntesis (Andersen et al., 2003), exportación nuclear así como también en la degradación de proteínas (Gonen et al., 1994), poseen actividad de chaperona (Suhando et al., 2014), intervienen en el metabolismo

primario y el mantenimiento de la estructura celular (Ohta et al., 1990). Además, están involucradas en la activación de la enzima fosfatidilinositol 4-kinase (componente esencial en diversas vías de señalización), o en la unión/interacción con la calmodulina (Numata et al., 2000; Ransom-Hodgkins, 2009) y otras funciones interesantes como su participación en infecciones y patologías como la replicación viral (Yamaji et al., 2010). Finalmente EF1 α es la segunda proteína más abundante después de la actina (Condeelis, 1995). Los distintos roles que cumple EF1 α en procesos celulares básicos hacen que los genes que codifican para la proteína, sean elegidos como genes de referencia o genes control.

El miembro más conocido e importante de la familia Caricaceae es la papaya (*Carica papaya*), cultivada en regiones tropicales y subtropicales. Su centro de origen probable es Centroamérica, y las mayores zonas productoras al rededor del mundo son Brasil, Nigeria, India, México e Indonesia (Ploetz & Ploetz, 2018.). Desde el punto de vista biotecnológico también es un cultivar importante ya que es el primer frutal de consumo humano que ha sido modificado genéticamente (Gonsalves, 2004) para conferirle resistencia al virus de la mancha anular de la papaya (de sus siglas en Inglés, Papaya Ring Spot Virus o PRSV) y cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (Ming et al., 2008). Es por esto que se considera un sistema prometedor en la investigación, debido a que su genoma es relativamente pequeño, con tan solo 372 megabases permite al investigador un mejor estudio de los genes, su aislamiento y mutación. Una comparación de su genoma con el de *Arabidopsis* arroja una nueva percepción sobre la historia evolutiva de la papaya. Se conoce que segmentos individuales del genoma de *Arabidopsis* corresponden a solo un segmento de papaya, indicando que no hubo duplicación del

genoma en el linaje de la caricácea desde su divergencia de *Arabidopsis* cerca de 72 millones de años atrás (Ming et al., 2008). Para *Carica papaya*, Zhu et al., (2012) evaluaron 21 genes que podían ser considerados como genes de referencia bajo diferentes condiciones experimentales (tejidos de distintos órganos, temperaturas de almacenamiento, etapas de desarrollo, maduración, modificación en la atmósfera, estrés biótico y tratamiento hormonal). Entre estos genes se encontró que EF1 α presentó la expresión más estable en las diferentes condiciones planteadas, a comparación con los demás genes (Actin, Gadh, 18S rRNA, entre otros). Es así, que se escogió a EF1 α como un representante adecuado para actuar como gen de control interno (Zhu et al., 2012).

Vasconcellea, comúnmente referida como papaya de montaña, está ampliamente relacionada con la papaya común (*Carica papaya*). Es el género que posee la mayor cantidad de miembros con 21 especies de las 35 conocidas (Scheldeman et al., 2006). La separación entre los géneros *Carica* y *Vasconcellea* se remonta hace 27 millones de años durante el oligoceno (Antunes et al., 2012). Se ha observado que las variedades vegetales silvestres poseen características de interés, como genes asociados a resistencia a virus, hongos, tolerancia a estrés por altas o bajas temperaturas (Bolger et al., 2014; d'Veckenbrugge et al., 2014) o sustancias químicas útiles para la industria, medicina o beneficiosas para la nutrición (Duarte & Paull, 2015; Scheldeman et al., 2006). A pesar de esto en la familia Caricaceae, tan solo la papaya ha captado la atención principal en lo que se refiere a la investigación biotecnológica, dejando de lado a otras especies que podrían ser de extrema utilidad como *Vasconcellea*.

El Ecuador posee 16 de las 21 especies de *Vasconcellea* conocidas (Scheldeman et al.,

2006). Entre ellas, *Vasconcellea pubescens*, también conocida como chamburo (este último como término propio de Ecuador), es un árbol nativo de la regiones subtropicales de Sur América, en especial de las regiones altas de Colombia y Ecuador (Gaete-Eastman et al., 2009). Debido a que *V. pubescens* (y otros miembros del género *Vasconcellea*) sigue siendo una especie silvestre escasamente estudiada, podría tener genes de interés que las variedades comerciales como la papaya han perdido por efecto de la domesticación. Sin embargo el estudio de genes control, resulta ser la base para dar inicio a investigaciones futuras en expresión de genes de interés, por esta razón el objetivo de la presente investigación fue identificar y reportar genes EF1 α en *V. pubescens* que podrían utilizarse como genes de control interno en aplicaciones futuras de esta especie silvestre.

Materiales y métodos

Los oligonucleótidos; Forward (TTC ACC CTT GGT GTC AAG C); Reverse (TAC CAG TCA AGG TTG GTG G) se diseñaron a partir de la secuencia genómica conocida de EF1 α de papaya para ser utilizados en *V. pubescens*. Para esto se utilizó el software NCBI/Primer-Blast y OligoAnalyser 3.1.

Plántulas de *V. pubescens* se sometieron a tres diferentes temperaturas (25, 45 y 55 °C) con la finalidad de evaluar si nuestro gen mostraba una expresión similar, de forma independiente a la temperatura. La extracción total del RNA de *V. pubescens* se realizó mediante TRIZOL de acuerdo con el protocolo descrito por (Chomczynski & Sacchi, 1987) con modificaciones. Posteriormente para el tratamiento con ADNasa se utilizó el Kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen™), según las instrucciones del fabricante.

Para el gen EF1 α se armó un total de 10 reacciones incluyendo un control negativo

con un volumen final de 25 μ l por reacción. Cada reacción contenía 2,2 μ l de ARN total tratado con ADNasa equivalente a una concentración de 200 ng. La RT-PCR se armó de la siguiente manera: síntesis de ADNc (55 °C, 20 min), pre-desnaturalización (1 ciclo, 94°C, 2 min), desnaturalización (94°C, 15 seg), alineamiento (35 ciclos, 60 °C, 30 seg) y extensión final (1 ciclo, 72°C, 5 min).

Posterior a la RT-PCR se realizó un gel de electroforesis al 2%. La expresión relativa de EF1 α fue cuantificada utilizando el software Image Lab™ 5.2.1 (Bio Rad) por densitometría. El fragmento obtenido VpEF1 α se secuenció en los laboratorios de la Universidad de las Américas Quito. Ecuador, a través de una secuenciación de segunda generación por el método de Sanger. Para el alineamiento se utilizó secuencias reportadas de EF1 α de 5 especies: *C. papaya* (número de accesión JQ678770 descrito por Zhu et al., 2012), *A. thaliana* (número de accesión AT1G07920.1), *Theobroma cacao* (número de accesión XM_007009689), *Populus trichocarpa* (número de accesión XM_002316315), *Nicotiana tabacum* (número de accesión AF120093) finalmente se utilizó la secuencia que codifica para la sub unidad RPN2b del proteasoma 26S (número de accesión AY242527) como outgroup. Se realizó la traducción a aminoácidos de las secuencias y se obtuvo el árbol filogenético mediante MEGA X a partir de las secuencias descritas. Adicionalmente, se generó la representación gráfica LOGO a partir de la plataforma en línea WebLogo, versión 2.8.2. El análisis estadístico de la intensidad de las bandas (densitometría) se realizó con el paquete RCommander.

Resultados y discusión

A la secuencia obtenida, propia de *V. pubescens* se denominó VpEF1 α . En la Figura 1 del alineamiento de nucleótidos se observó

que los fragmentos son similares entre sí (salvo variaciones puntuales), que podrían explicarse como propias de la planta. De forma interesante se observó que el porcentaje de identidad (PI) de *VpEfl α* era el mismo al compararse con *CpEfl α* y *PtEfl α* con un valor de 91.33% mientras que, entre *CpEfl α* y *PtEfl α* el PI fue de 90.17% y entre *CpEfl α* y *TcEfl α* 92.49%, esto quiere decir que las secuencias tipo *Efl α* de papaya y cacao, se parecen más entre sí (lo que se aprecia también más adelante en el árbol filogenético). En este estudio, los porcentajes de identidad de las secuencias estudiadas son altos, superan en todos los casos el 84%. De forma general este efecto es el mismo en otras especies vegetales y ha permanecido constante durante la historia evolutiva de las mismas

evidenciando la importancia de los genes *Efl α* en estos organismos. Los genes que codifican para Elongation Factor son producto de una antigua duplicación de genes, que podría ser incluso anterior a la divergencia de todos los linajes de organismos existentes (Baldauf et al., 1996). Según Baldauf (1996), genes que codifican para EF están presentes ampliamente en los tres dominios: bacterias, eucariotas y arqueas. Siendo así que los autores propusieron que el origen de los organismos eucariotas procede de las arqueas, todo esto basado en secuencias EF. El hecho de que las secuencias se mantengan tan conservadas y similares indica que ya estaban presentes en LUCA (del inglés Last Universal Common Ancestor) (Leipe et al., 2002)

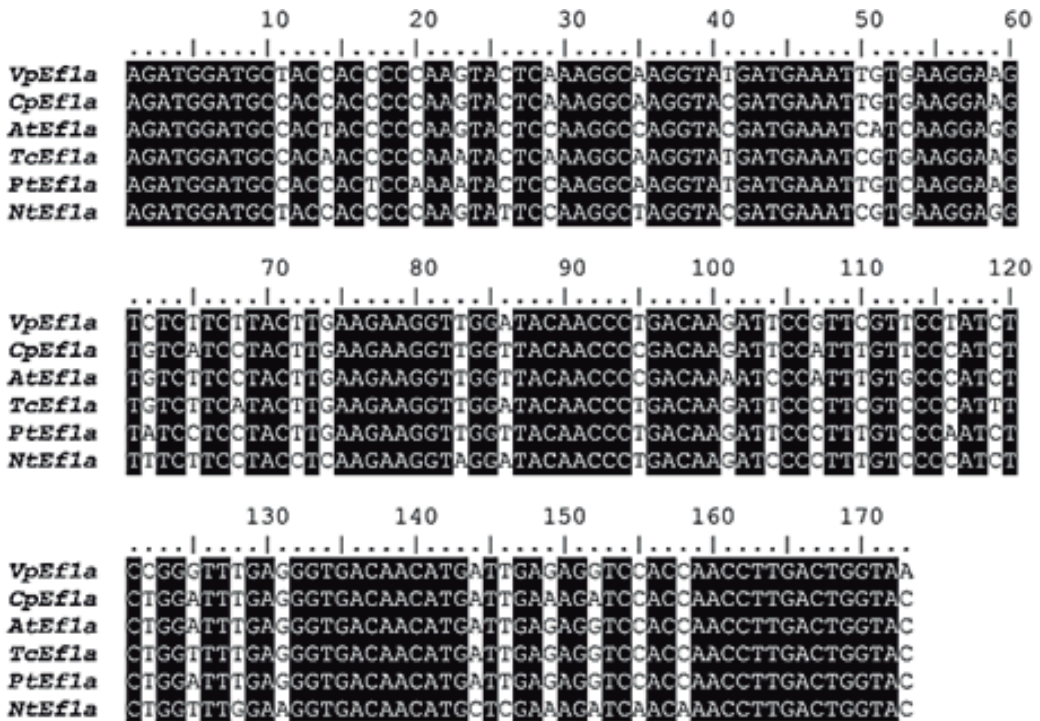


Figura 1. Alineamiento de nucleótidos de secuencias *Efl α* seleccionadas, los bloques negros representan que las secuencias son idénticas, los bloques blancos indican variación de nucleótidos.

Elaborado por: Cevallos, T. (2018).

A partir de las secuencias de nucleótidos traducidas a aminoácidos, se obtuvo cadenas peptídicas de 56 aa (aminoácidos) de longitud. El árbol filogenético (Figura 2) indicó que todas las secuencias compartieron un ancestro común, por lo tanto, están relacionadas entre sí.

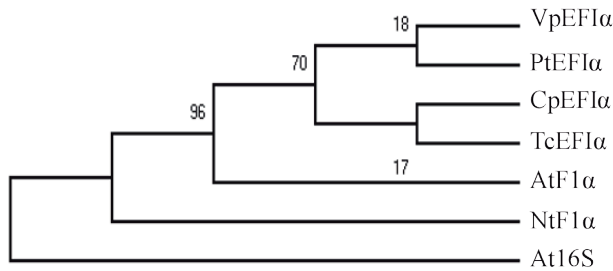


Figura 2. Análisis filogenético molecular de secuencias de aminoácidos tipo EF1α de especies seleccionadas y VpEF1α.

Elaborado por: Cevallos, T. (2018).

La secuencia proteica de VpEF1α se agrupó directamente con la secuencias de álamo, cacao y papaya formando un solo clado representado por I, este resultado es consistente con el hecho de que *C. papaya* guarda mayor relación con especies arbóreas al compartir un mayor número de genes relacionados con la expansión celular (Ming, 2018) y adicionalmente con que los genes de tipo EF1α están relacionados con el crecimiento y desarrollo (Liu et al., 2016). A pesar de que *A. thaliana* es una herbácea comparten el mismo orden (Brassicales) que *V. pubescens* y *C. papaya* lo que explicaría que comparta un ancestro común con el clado I pero no se encuentre dentro de este clado. Por otra parte, *N. tabacum* pertenece a la familia Solanaceae con orden Solanales, diferencias que podrían explicar que aparezca sola, como un clado diferente.

El diseño de WebLogo obtenido a partir de las secuencias proteicas, indicó un elemento



Figura 3. Gráfica WebLogo de las secuencias proteicas EF1α, la flecha gris representa una parte del elemento NKXD del dominio de unión GTP. El espiral representa una hélice y la flecha negra una hoja β plegada.

Elaborado por: Cevallos, T. (2018).

A través de una predicción proteica realizada con JPred4 (Drozdetskiy et al., 2015) se logró determinar la presencia de estructuras secundarias en las secuencia EF1 α que hemos detallado en la misma ilustración de WebLogo. Adicionalmente, una cadena de polipéptido de 17 aa con una estructura de tipo α -hélice y otra de 3 aa tipo lámina- β fue identificada.

Todo lo que se describió anteriormente se realizó con la finalidad de ilustrar que,

aunque se trataba de una secuencia de nucleótidos corta, pudimos aportar con información inédita sobre VpEF1 α .

El gel de electroforesis (Figura 4) y el análisis estadístico de la expresión relativa de VpEF1 α , no indicó ninguna diferencia significativa de la intensidad de las bandas en cada temperatura (25, 45, 55 °C). Por lo tanto, estadísticamente la intensidad fue la misma en las tres temperaturas establecidas.

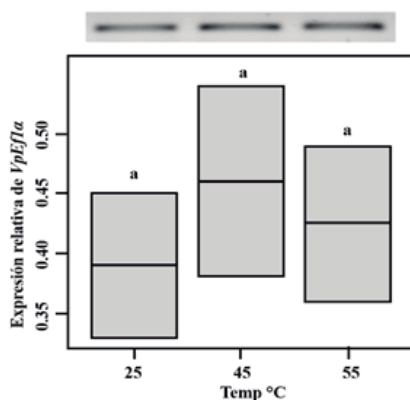


Figura 4. Expresión relativa del gen VpEF1 α a diferentes temperaturas, en la parte superior de la figura se aprecian bandas correspondientes a los productos de RT-PCR. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa con $p < 0.01$.

Elaborado por: Cevallos, T. (2018).

La estabilidad de un gen control bajo diferentes condiciones de estrés debe ser constante, a su vez, los genes de control interno adecuados varían entre cada planta y tejido de la misma. Estudios en melocotón cuestionaron la estabilidad de genes de referencia comúnmente conocidos como ARN ribosómico 18S, β -actina (ACT) la gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Sugieren que estos genes se deben utilizar con precaución como controles internos, ya que mostraron diferentes comportamientos en diferentes condiciones de experimento. La razón se sustenta en que estos genes no solo participan en el metabolismo celular sino en otros procesos celulares (Suzuki et al., 2000).

Si bien ya existe un estudio en donde EF1 α , ha sido utilizado como gen control en *V. pubescens* bajo estrés abiótico (Gaete-Eastman et al., 2009), los autores no presentan información de la secuencia del producto amplificado ni la caracterizaron. Aun así, el estudio de Gaete (2009) demuestra la estabilidad de esta secuencia putativa EF1 α como control interno incluso durante una PCR en tiempo real. Del mismo modo, EF1 α fue utilizado como housekeeping durante un estudio realizado en *C. papaya*, comprobando así la expresión constante del gen bajo condiciones abióticas (Chan-León et al., 2017). Adicionalmente, diferentes estudios, han comprobado que el mismo resulta ser estable bajo estrés biótico en tejidos de hoja

y raíz de manzana (*Malus domestica*) (Kumar & Singh, 2015). De igual manera, EF1α resultó ser el gen de control interno con mayor estabilidad para la prueba de estrés biótico; tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum*). Este mismo estudio comprueba la estabilidad del gen bajo estrés abiótico como el frío y estrés salino (Nicot et al., 2005). De igual manera, EF1α también resultó ser un gen estable, bajo estrés abiótico (calor, frío, hormonas, y deshidratación), así como, bajo estrés biótico (*Pseudoperonospora cubensis*) en pepino (*Cucumis sativus*) (Joseph et al., 2018). A pesar que, EF1α no ha sido utilizado como gen de control bajo estrés biótico en *V. pubescens* ni *C. papaya*, este sí ha sido utilizado como gen de control de estrés abiótico en estas especies (Gaete-Eastman et al., 2009; Zhu et al., 2012; Chan-León et al., 2017).

Conclusiones

Existe al menos una secuencia génica tipo EF1α para *V. pubescens* (chamburo), la secuencia de nucleótidos (y su traducción proteica) presentan características similares a secuencias EF1α conocidas en otras especies vegetales y respondió en este estudio in vivo, de forma constitutiva y homogénea como un prometedor gen de control interno bajo condiciones de estrés por calor. Se requieren más ensayos para determinar el comportamiento de este gen bajo otras condiciones experimentales abióticas y bióticas. Al no existir estudios de estrés biótico en *V. pubescens*, EF1α podría ser considerado como un gen de control interno prometedor en este tipo de investigación. Por lo que se recomienda realizar pruebas bajo este tipo de condiciones a la que la planta esté normalmente expuesta. Finalmente, se demostró la utilidad de este gen como control interno en *V. pubescens* bajo estrés abiótico en plántulas sometidas a temperatura.

Agradecimientos

Al Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE) por los permisos concedidos (MAE-DNB-CM-2017-0063), a Rosa Vilatuña, por su apoyo incondicional y consejos. Este trabajo fue financiado por la UDLA (proyecto INV/F/PPI/1/0814).

Literatura Citada

- Andersen, G. R., Nissen, P., & Nyborg, J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(8), 434–441. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00162-2)
- Antunes Carvalho, F., & Renner, S. S. (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.019>
- Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C., & Lescure, B. (1989). The gene family encoding the Arabidopsis thaliana translation elongation factor EF-1α: Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics* MGG, 219(1–2), 106–112. <https://doi.org/10.1007/BF00261164>
- Baldauf, S. L., Palmer, J. D., & Doolittle, W. F. (1996). The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7749–7754. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7749>
- Barsalobres-Cavallari, C. F., Severino, F. E., Maluf, M. P., & Maia, I. G. (2009). Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-1>

- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M. E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., ... Fernie, A. R. (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics*, 46(9), 1034–1038. <https://doi.org/10.1038/ng.3046>
- Chan-León, A. C., Estrella-Maldonado, H., Dubé, P., Fuentes Ortiz, G., Espadas-Gil, F., Talavera May, C., ... Santamaría, J. M. (2017). The high content of β -carotene present in orange-pulp fruits of *Carica papaya* L. is not correlated with a high expression of the CpLCY- β 2 gene. *Food Research International*, 100(August), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.017>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Condeelis, J. (1995). Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(5), 169–170.
- d'Eeckenbrugge, G. C., Drew, R., Kyndt, T., & Scheldeman, X. (2014). *Vasconcellea* for Papaya Improvement. In *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 47–79). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_4
- Dever, T. E., Glynias, M. J., & Merrick, W. C. (1987). GTP-binding domain: Three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(7), 1814–1818. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.1814>
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- Duarte, O., & Paull, R. E. (n.d.). Exotic fruits and nuts of the New World.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- Gaete-Eastman, C., Figueroa, C. R., Balbonín, C., Moya, M., Atkinson, R. G., Herrera, R., & Moya-León, M. A. (2009). Expression of an ethylene-related expansin gene during softening of mountain papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*). *Postharvest Biology and Technology*, 53(1–2), 58–65. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2009.03.007>
- Gonen, H., Smith, C. E., Siegel, N. R., Kahana, C., Merrick, W. C., Chakraborty, K., ... Ciechanover, A. (1994). Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7648–7652. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7648>
- Gonsalves, D. (2004). Transgenic Papaya in Hawaii and Beyond.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140>
- Joseph, J. T., Poolakkalody, N. J., & Shah, J.

- M. (2018). Plant reference genes for development and stress response studies. *Journal of Biosciences*, 43(1), 173–187. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9728-z>
- Kumar, G., & Singh, A. K. (2015). Reference gene validation for qRT-PCR based gene expression studies in different developmental stages and under biotic stress in apple. *Scientia Horticulturae*, 197, 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.025>
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 41–72. <https://doi.org/10.1006/jm-bi.2001.5378>
- Li, Q.-F., Sun, S. S. M., Yuan, D.-Y., Yu, H.-X., Gu, M.-H., & Liu, Q.-Q. (2010). Validation of Candidate Reference Genes for the Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data in Rice During Seed Development. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s11105-009-0124-1>
- Liu, J. H., Li, Y. C., Zhang, J., Gao, P. Z., Wang, A. B., Zhang, N., ... Jin, Z. Q. (2016). Banana MaEF1A facilitates plant growth and development. *Biologia Plantarum*, 60(3), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0613-7>
- Løvdaal, T., & Lillo, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.024>
- Luo, H. L., Luo, L. P., Guan, B. C., Li, E. X., Xiong, D. J., Sun, B. T., ... Yang, B. Y. (2014). Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR in lily (*Lilium brownii*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(3), 345–351. <https://doi.org/10.1080/14620316.2014.11513089>
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., ... Alam, M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190), 991–996. <https://doi.org/10.1038/nature06856>
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- Numata, O., Kurosawa, Y., Gonda, K., & Watanabe, Y. (2000). Tetrahymena Elongation Factor-1 Is Localized with Calmodulin in the Division Furrow. *Journal of Biochemistry*, 127(1), 51–56. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022583>
- Ohta, K., Toriyama, M., Miyazaki, M., Murofushi, H., Hosoda, S., Endo, S., & Sakai, H. (1990). The mitotic apparatus-associated 51-kDa protein from sea urchin eggs is a GTP-binding protein and is immunologically related to yeast polypeptide elongation factor 1 alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3240–3247.
- Ploetz, C., & Ploetz, R. C. (n.d.). INTERNATIONAL COMMISSION ON TROPICAL BIOLOGY AND NATURAL RESOURCES-Tropical Fruit Crops and the Diseases that Affect Their Production-R TROPICAL FRUIT CROPS AND THE DISEASES THAT AFFECT THEIR PRODUCTION.
- Ransom-Hodgkins, W. D. (2009). The application of expression analysis in elucidating the eukaryotic elongation factor one alpha gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecu-*

- lar Genetics and Genomics, 281(4), 391–405. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0418-2>
- Scheldeman, X., Willemen, L., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Romeijn-Peeters, E., Restrepo, M. T., Romero Motoche, J., ... Goetgebeur, P. (2006). Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. In *Plant Conservation and Biodiversity* (pp. 293–310). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6444-9_19
- Suhandono, S., Apriyanto, A., & Ihsani, N. (2014). Isolation and Characterization of Three Cassava Elongation Factor 1 Alpha (MeEF1A) Promoters. *PLoS ONE*, 9(1), e84692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084692>
- Suzuki, T., Higgins, P. J., & Crawford, D. R. (2000). Control Selection for RNA Quantitation. *BioTechniques*, 29(2), 332–337. <https://doi.org/10.2144/00292rv02>
- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., & Zhang, Z. (2009). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-71>
- Turabelidze, A., Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair and Regeneration*, 18(5), 460–466. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x>
- Yamaji, Y., Sakurai, K., Hamada, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Yoshida, A., ... Hibi, T. (2010). Significance of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection. *Archives of Virology*, 155(2), 263–268. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0571-x>
- Zhu, X., Li, X., Chen, W., Chen, J., Lu, W., Chen, L., & Fu, D. (2012). Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. *PloS One*, 7(8), e444405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044405>