



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

Expresión de genes en aguacate ante variantes del

Avocado sunblotch viroid

LUIS ALBERTO LÓPEZ RIVERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México

2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

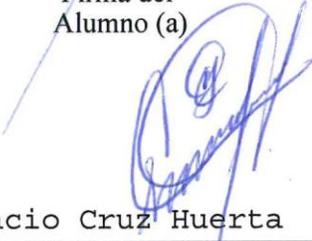
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Luis Alberto López River, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Nicacio Cruz Huerta, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Expresión de genes en aguacate ante variantes del Avocado sunblotch viroid

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 18 de Julio de 2017



Firma del
Alumno (a)



DR. Nicacio Cruz Huerta

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: EXPRESIÓN DE GENES EN AGUACATE ANTE VARIANTES DEL *Avocado sunblotch viroid*, realizada por el alumno: LUIS ALBERTO LÓPEZ RIVERA, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

Dr. Nicacio Cruz Huerta

ASESOR:

Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR:

Dr. Víctor Arturo González Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2017

EXPRESIÓN DE GENES DE AGUACATE ANTE VARIANTES DEL *Avocado sunblotch viroid*

Luis Alberto López Rivera, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Gran parte de la respuesta inmune en las plantas es asignada a las proteínas relacionadas con la patogénesis. En aguacate, su participación se ha demostrado en defensa contra algunos de sus patógenos más importantes. Sin embargo, en la enfermedad de la mancha de sol (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) aún queda algunos componentes de la respuesta de defensa por aclarar. En particular, la infección por ASBVd presenta variantes asintomáticas que generan incógnitas sobre la defensa del aguacate a la infección. En este sentido, esta investigación analiza la expresión de genes codificantes de proteínas de defensa, *NPR1*, *EREBP*, *PR-5* y *PR-6* en la infección de dos variantes del ASBVd en hojas y frutos de aguacate. Nuestro análisis muestra que la infección de ASBVd es capaz de modificar la expresión de los genes *PR-5* y *PR-6*, mientras que *NPR1* y *EREBP* no se modifican. Encontramos diferencias significativas en la expresión de frutos, siendo notable con *PR-5* en frutos asintomáticos; a su vez, *PR-6* se expresa significativamente en los frutos infectados pero sin diferencias entre sintomático y asintomático. La expresión coordinada de ambos genes en frutos sugiere la activación de un mecanismo sinérgico de respuesta de defensa a la infección de ASBVd.

Palabras clave: *Avocado sunblotch viroid*, *Persea americana*, genes *PR*, mancha de sol, árboles sintomáticos, árboles asintomáticos.

AVOCADO GENE EXPRESSION IN VARIANTS OF *Avocado sunblotch viroid*

Luis Alberto López Rivera, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Immune response in plants depends on pathogenesis-related proteins. In avocado, their involvement has been shown in defense against some of its most important pathogens. However, in sunblotch disease (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) there are some components of the defense response to be elucidated. In particular, ASBVd infection presents symptomless variants that raise questions about avocado defense to infection. To address this, this research analyzes expression changes in genes encoding defense proteins, *NPR1*, *EREBP*, *PR-5* and *PR-6*, in leaves and fruits infected with two variants of ASBVd. Our analysis shows that ASBVd infection is capable of modifying the expression of *PR-5* and *PR-6* genes, while *NPR1* and *EREBP* are not modified. We found significant differences in gene expression in fruits, particularly on *PR-5* in symptomless fruits; in contrast, *PR-6* is expressed significantly in infected fruits but no significant differences were observed between symptomatic and symptomless trees. The coordinated expression of both genes in fruits suggests the activation of a synergistic mechanism of defense response to ASBVd infection.

Keywords: *Avocado sunblotch viroid*, *Persea americana*, *PR* genes, symptomatic trees, symptomless trees

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Colegio de Postgraduados por haberme permitido formarme en esta institución, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a todos ustedes, fueron ustedes los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se vera reflejado en la culminación de mi paso por la institución.

Gracias al CONACYT por el financiamiento que me permitio convertirme en un profesional en lo que tanto me apasiona, y que deja como producto terminado, y como recuerdo y prueba viviente en la historia; esta tesis, que perdurará dentro de los conocimientos y desarrollo de las demás generaciones que están por llegar.

Este es un momento muy especial que espero, perdure en el tiempo, no solo en la mente de las personas a quienes agradecí, sino también a quienes invirtieron su tiempo para echarle una mirada a mi proyecto de tesis; a ellos asimismo les agradezco con todo mí ser.

A Luly

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. Objetivos particulares	4
1.2. Hipótesis	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Particularidades del aguacate	4
2.2. Sistema inmune de las plantas	5
2.3. Expresión de genes en aguacate	7
2.4. NPR1: regulador de la inmunidad en plantas	9
2.4.1. Propiedades biológicas	9
2.4.2. Mecanismos y ocurrencia	10
2.5. <i>EREBP</i> : proteína de unión al elemento de respuesta al etileno	11
2.5.1. Propiedades biológicas	12
2.5.2. Mecanismos y ocurrencia	12
2.6. Genes de proteínas PRs	13
2.6.1. Proteínas PR-5: similar a taumatina	14
2.6.2. Proteínas PR-6: inhibidor de proteasas	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Extracción de RNA total del material vegetal	18
3.2. Selección de genes	19
3.3. Análisis molecular	19
3.4. Detección e identificación del ASBVd	20
3.5. Cuantificación de la expresión por análisis de imagen y densitometría	21
3.6. Análisis estadístico	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Aislamiento, identificación y análisis de la variación de secuencias del ASBVd	22
4.2. Evaluación de la expresión de genes de defensa	26
4.3. Análisis de densitometría	26
5. DISCUSIÓN	28

5.1. Análisis de las secuencias aisladas.....	29
5.2. <i>PaNPR1</i> en respuesta a la infección del ASBVd.....	31
5.3. Factor de transcripción ERF.....	31
5.4. Genes de proteínas PR.....	32
6. CONCLUSIONES.....	34
7. LITERATURA CITADA.....	34

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Temperaturas de alineamiento empleadas para ejecutar la RT-PCR de un solo paso y tamaño de los productos esperados.....	20
Cuadro 2. Valores E y porcentaje de identidad de nueve secuencias obtenidas de la banda de 250 pb en muestras de árboles infectados con ASBVd.	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de integridad del RNA total.....	22
Figura 2. Detección del viroide de la mancha de sol en aguacate.....	22
Figura 3. Alineamiento de múltiples secuencias	25
Figura 4. Productos de la amplificación de genes de defensa	26
Figura 5. Análisis cuantitativo de las intensidades de los productos de la RT-PCR de los genes relacionados con defensa.....	27

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un cultivo frutícola de importancia en México con una producción en 2015 de 1.6 millones de toneladas que representaron un valor de producción de 22 mil millones de pesos (SIAP, 2015). A pesar del éxito que el cultivo ha tenido, este sucumbe ante plagas y patógenos originados en sus ambientes naturales o introducidos que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo, reducen el rendimiento agronómico y perjudican la calidad de frutos (Dann *et al.*, 2013).

Las plantas son incapaces de moverse para escapar de los desafíos del ambiente obligándolas a proceder alternativamente para defenderse; por ello las plantas han evolucionado mecanismos pasivos (barreras físicas y químicas) (Nühse, 2012), fisiológicos (Taiz y Zeiger, 2002), bioquímicos (Martin *et al.*, 2003), moleculares (Schreiber *et al.*, 2016) y genéticos (Wiesner-Hanks y Nelson, 2016) para resistir el embate de patógenos y otros tipos de estrés. La carencia de células defensoras móviles y de un sistema inmune circulatorio en plantas las obliga a que confíen en la inmunidad innata de cada célula y en un sistema de señales resultado de la infección (Jones y Dangl, 2006; Spoel y Dong, 2012). Entonces, las plantas han desarrollado estrategias para percibir dichos ataques y traducirlos a una respuesta adaptativa. Esta habilidad para detectar microorganismos y organizar una respuesta ha sido fundamental para la evolución y supervivencia de las plantas (Conrath *et al.*, 2015; Hilker *et al.*, 2016).

Afinar los mecanismos de respuesta para controlar efectivamente la propagación de plagas y patógenos requiere la inversión de un alto costo de energía (Cipollini *et al.*, 2014). Los factores de transcripción tienen un rol importante en los mecanismos de defensa coordinando la expresión de genes (Garner *et al.*, 2016). La proteína NPR1 (*NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1*) es un co-regulador transcripcional de diversos genes involucrados en la respuesta inmune de las plantas (Mukhtar *et al.*, 2009), actúa como un modulador en la expresión de genes de proteínas PR (*Pathogenesis-Related*) al interactuar con los factores de transcripción (Pieterse y van Loon, 2004). Así mismo, NPR1 modula la inter-comunicación entre la ruta del ácido salicílico y la ruta ácido jasmónico/etileno (Spoel *et al.*, 2003; Leon-Reyes *et al.*, 2009).

Otro gen relacionado con defensa es el que codifica la proteína de unión al elemento de respuesta al etileno (EREBP) que pertenece a la familia de factores de transcripción AP2/ERF (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS*) cuya regulación de genes mantienen el balance entre las rutas de respuesta al estrés y desarrollo (Dietz *et al.*, 2010; Phukan *et al.*, 2017) y se caracterizan por su afinidad en la unión con la caja GCC (AGCCGCC), que es una secuencia conservada en la región del promotor de los genes *PR* inducidos por etileno (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995).

Un papel importante dentro de las respuestas de defensa es asignado a las proteínas PR (Bol *et al.*, 1990; Stintzi *et al.*, 1993; Ebrahim *et al.*, 2011). Estas se han definido como proteínas codificadas por una planta hospedera pero inducidas solo en situaciones patológicas o relacionadas (van Loon *et al.*, 1994). Se clasifican en 17 familias de acuerdo a sus funciones y propiedades (van Loon *et al.*, 2006).

En la búsqueda de destacar genes regulados durante las respuestas de defensa a patógenos en aguacate se han elaborado estudios de perfiles de expresión que han revelado las bases moleculares de la interacción planta-patógeno, enfocadas principalmente en infecciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2012) y *Phytophthora cinnamomi* (Mahomed y Van Den Berg, 2011). En aguacate han destacado los genes *PR* por favorecer un mecanismo inmune inducido de defensa de la planta conocido como resistencia sistémica adquirida (Fu y Dong, 2013).

En este trabajo se seleccionaron genes codificantes de proteínas PR, que actúan en respuesta al etileno y ácido salicílico, y que son regulados transcripcionalmente por NPR1 y EREBP, para ser evaluados en la infección del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), causante de la enfermedad de la mancha de sol en aguacate (Palukaitis *et al.*, 1979; Desjardins, 1987).

El ASBVd es un agente infeccioso formado por una molécula de RNA circular de cadena sencilla con una variación de secuencia de 246 a 251 nucleótidos (Symons, 1981; Rakowski y Symons, 1989; Schnell *et al.*, 2001). Las diferencias en secuencia se han asociado a una diversificación de síntomas que también incluye una variante asintomática (Semancik y Szychowski, 1994). Los síntomas de la mancha de sol se

caracterizan por presentar daños severos en los frutos, que incluyen heridas deprimidas en la superficie del fruto que van desde color amarillo, verde-amarillento, rosado, hasta llegar a manchas necróticas (Desjardins, 1987); además afecta la fisiología y calidad postcosecha en características de valor comercial (Vallejo-Pérez *et al.*, 2015).

La variante asintomática toma relevancia debido a que su producción es continua en todo el hospedante (Semancik y Szychowski, 1994); esto es importante particularmente para la transmisión por semilla (Wallace, 1967), y a pesar de que no se presentan síntomas visibles, esta se caracteriza por una marcada reducción en la producción de fruta (Saucedo-Carabez *et al.*, 2014).

La principal forma de transmisión de este patógeno es por injertos (Haas, 1952) lo que limita el control efectivo de la enfermedad. La detección es fundamental para aplicar manejo preventivo de diseminación (Barrera y Rojas, 2007; Luttig y Manicom, 1999); donde algunas recomendaciones son la remoción de árboles con síntomas y su destrucción (Schnell *et al.*, 2011), y la desinfección de herramientas (Desjardins *et al.*, 1987).

En México, la producción comercial de plantas de aguacate se basa en utilizar portainjertos originados de semilla, lo que genera una alta heterogeneidad (Salazar-García *et al.*, 2004). En la búsqueda de patrones tolerantes a enfermedades, los análisis comparativos de expresión de genes, que incluyen interacciones planta-patógeno, han provisto información para priorizar los genes candidatos para una caracterización funcional (Engelbrecht y Van Den Berg, 2013; Zhang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016).

El manejo de enfermedades en el cultivo de aguacate ha manifestado la necesidad de desarrollar variedades y portainjertos resistentes como parte de un acercamiento integrado a la reducción de la incidencia, por lo que se requiere un entendimiento de las respuestas de defensa en los diferentes patosistemas.

En este trabajo se partió de la hipótesis que la cascada de expresión en respuesta de defensa del aguacate al ASBVd, causante de la enfermedad de la mancha de sol en aguacate (Palukaitis *et al.*, 1979; Desjardins, 1987) es diferente en árboles asintomáticos de aquellos que presentan síntomas, lo que posiblemente indica una capacidad de

defenderse del ataque de esta enfermedad. El objetivo de este estudio es describir los cambios en niveles de expresión de los genes de defensa seleccionados en plantas infectadas sintomáticas y asintomáticas de la infección de ASBVd en aguacate para explicar las respuestas de defensa determinantes en este patosistema.

1.1. Objetivos

Distinguir los niveles de expresión de genes relacionados con defensa en árboles de aguacate infectado con variantes sintomáticas y asintomáticas de ASBVd.

1.1.1. Objetivos particulares

- a. Evaluar la expresión de un gen perteneciente a NPR1 en aguacate infectado con ASBVd.
- b. Evaluar la expresión de un gen miembro de la familia de factores de transcripción AP2/ERF.
- c. Evaluar la expresión de genes codificantes de proteínas PR-5 y PR-6 en aguacate infectado con ASBVd.
- d. Diferenciar los niveles de expresión de los genes relacionados con defensa entre los árboles sanos, sintomáticos y asintomáticos.

1.2. Hipótesis

Los genes relacionados con defensa son expresados durante la infección con ASBVd sin importar la aparición de síntomas o no. Sin embargo, los niveles de expresión varían entre árboles sintomáticos y asintomáticos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Particularidades del aguacate

El aguacate es una de las frutas más cultivadas en países tropicales y subtropicales tanto a nivel de subsistencia como comercial (FAO, 2011b), esta considerada dentro del

grupo de frutas tropicales mayores ocupando el quinto lugar de producción mundial (FAO, 2011a). México se ha consolidado como el principal consumidor y productor de esta fruta a nivel mundial (Macías, 2011). Tiene una superficie sembrada de 187 mil hectáreas, produce 1,644,226 ton, y se exportan mas de 900 mil toneladas, principalmente a EUA, con ingresos de 1,920 millones de USD (SIAP, 2016). Además, el sector aguacatero en México genera 42 mil empleos permanentes y 31 mil temporales (Arana *et al.*, 2015).

El cultivo comercial de aguacate actual corresponde a la especie *Persea americana* Mill., perteneciente a la familia *Lauraceae* (Chanderbali *et al.*, 2013). Se cree que su domesticación en Mesoamérica pudo ocurrir incluso antes que algunos cultivos anuales (Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Esta especie es referente del sub-genero *Persea*, cuya mayoría de miembros se cree son originarios de México, Guatemala y América Central (Sánchez-Pérez, 1999), pero su distribución se ha extendido mundialmente debido a su adaptabilidad y productividad en un amplio rango de ambientes (Bost *et al.*, 2013). Se han descrito tres razas ecológicas de *P. americana* distinguibles entre ellas: raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), raza guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y raza antillana (*P. americana* var. *americana*) (Bergh y Ellstrand, 1986).

El aguacate es una fruta de gran valor nutricional para el consumo humano (Ortega, 2003), como fuente natural de ácidos grasos monoinsaturados (Duester, 2001), con actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2010) y con efectos potenciales favorecedores a la salud debido a su composición (Dreher y Davenport, 2013).

2.2. Sistema inmune de las plantas

Las plantas han desarrollado un sistema inmune de varios niveles en cada célula para poder defenderse del ataque de patógenos. Los patógenos potenciales deben primero acceder a la planta, ya sea penetrando la superficie de las hojas o raíces o a través de heridas y aberturas naturales.

La primera barrera física presentada por las células es la pared celular (Underwood, 2012). Muchos patógenos disponen de diversas estrategias para superar la

pared celular (Bellincampi *et al.*, 2014). Al penetrar la pared celular, la membrana extracelular queda expuesta y se genera una interacción muy cercana (Hématy *et al.*, 2009; Underwood, 2016). Esta irrupción contribuye a la inducción de la defensa donde los patrones moleculares derivados del daño (*damage-associated molecular patterns* o DAMPs) activan las señales de defensa (Nühse, 2012).

La primera línea de respuesta inmune (PTI o *PAMP-triggered immunity*) es activada por los patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o *pathogen-associated molecular patterns*; MAMPs o *microbe-associated molecular patterns*) (Wu *et al.*, 2014). Estos patrones moleculares son reconocidos por receptores asociados a la membrana del hospedante (*pattern recognition receptors* o PRRs) (Macho y Zipfel, 2014), que generalmente consisten de un dominio extracelular LRR (*leucine-rich repeat*) y un dominio intracelular de quinasa (Dodds y Rathjen, 2010). Usualmente esta respuesta inmune detiene la infección, sin embargo, diversos patógenos han evolucionado para suprimir la PTI (Degrave *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2016).

La secreción de proteínas patogénicas, llamadas efectoras, es un elemento clave para el desarrollo de la patogénesis (Toruño *et al.*, 2016). Estas proteínas modifican la respuesta inmune de la planta y facilitan la infección (Dagdas *et al.*, 2016; Sperschneider *et al.*, 2016). Las proteínas efectoras secretadas por los patógenos son reconocidas por receptores específicos intracelulares del hospedante (Ellis, 2016; Kroj *et al.*, 2016; Sarris *et al.*, 2016), conocidos como proteínas de resistencia (R), las cuales se clasifican de acuerdo a su dominio (Martin *et al.*, 2003) y son las responsables de accionar la inmunidad activada por los efectores (*effector-triggered immunity* o ETI) (Chisholm *et al.*, 2006).

Los eventos tempranos que ocurren a continuación, activados tanto por la PTI como por la ETI, incluyen: incremento en el flujo de iones (Brauer *et al.*, 2016), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Camejo *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016), activación de las MAP quininas (MAPKs) (Meng y Zhang, 2013), cambios en la fosforilación de proteínas (Couto *et al.*, 2016; Durian *et al.*, 2016) síntesis de etileno (Mase *et al.*, 2012).

Estos eventos tempranos están involucrados en la señalización de respuestas de defensa intermedias y tardías, incluyendo la inducción de proteínas PR (Kitajima y Sato, 1999), deposición de callosa (Shetty *et al.*, 2009), reforzamiento de la pared celular (Delaunois *et al.*, 2014), biosíntesis de fitoalexinas (Jeandet *et al.*, 2013) y respuestas hipersensitivas (Hernández *et al.*, 2016); esta última es, en esencia, una muerte celular programada que elimina los sitios de infección (Heath, 2000; Mittler *et al.*, 1997).

2.3. Expresión de genes en aguacate

El crecimiento, el desarrollo, y las respuestas ambientales están programadas en los genes. La expresión o represión de estos genes requiere de señales internas y externas (Sultan, 2000) que llevan a cabo normalmente su señalización por medio de secuencias de reacciones bioquímicas, llamadas rutas de transducción de señales (Xing y Jordan, 2000).

En la búsqueda de destacar genes regulados en aguacate durante las etapas de maduración de fruto han sido elaborados destacados estudios. El incremento de mRNAs de frutos con el aumento de respiración y producción de etileno permitió relacionar la maduración con genes específicos (Christoffersen *et al.*, 1982). Partiendo de aquí se han aislado y caracterizado aquellos genes que codifican para celulasa, cuya acumulación de transcriptos juega un papel mayor en la maduración del fruto (Christoffersen *et al.*, 1984; Cass *et al.*, 1990). Por ejemplo, la actividad enzimática de citocromo P-450 está relacionada con cambios en la textura y sabor (Bozak *et al.*, 1990); ACC sintasa actúa como reguladora de la síntesis etileno (McGarvey *et al.*, 1992); y poligalacturonasa interviene en el reblandecimiento del tejido del mesocarpio (Kutsunai *et al.*, 1993).

La acumulación de mRNAs *cel1*, un miembro de la familia de genes de celulasa, esta involucrada en el proceso de abscisión (Tonutti *et al.*, 1995). Algo similar ocurre con tres genes de la familia 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa, *PaNCED1*, *PaNCED2* y *PaNCED3*, que están involucrados en la síntesis de ácido abscísico durante la maduración (Chernys y Zeevaart, 2000). En el reblandecimiento de la fruta en postcosecha están implicados los genes *PaGAL2*, *PaGAL3* y *PaGAL4* codificantes de β -

galactosidasa, que participan en el metabolismo de la galactosa durante el desarrollo y maduración (Tateishi *et al.*, 2007).

El gen *AVOe3* opera en la síntesis de etileno durante la madurez del fruto (McGarvey *et al.*, 1992). Por su parte, *PA-ACCS1* y *PA-ACCS2* despliegan regulación positiva y negativa, respectivamente de la ACC sintasa, mientras que *PA-ACO*, codificante de ACC oxidasa, muestra regulación positiva inducida por heridas (Owino *et al.*, 2002).

La secuencia total del cDNA de poligalacturonasa fue obtenida por Dopico *et al.* (1993) y precisaron su retraso en la aparición de mRNAs durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Asociado a esto, García-Rojas *et al.* (2012) identificaron seis genes relacionados con pérdida de calidad en postcosecha: poligalacturonasa (*PamPG*), putativo NAD⁺-dependiente sorbitol dehidrogenasa (*PamSDH*), stearyl-ACP desaturasa (*SAD*) y tres putativos de acil-CoA sintetasa (*PamACoAS1*, 2, 3).

El metabolismo de lípidos, se basa en la expresión de *PamACCcase-BC* y *PamACCcase-BCCP*, codificantes de una multi-subunidad de la enzima acetil-CoA carboxilasa. Esta enzima es clave en la síntesis de ácidos grasos y es regulada en desordenes fisiológicos del desarrollo en el almacenamiento en frío (Gudenschwager *et al.*, 2013).

En cuanto a genes implicados en el desarrollo, se han identificado los cDNAs de *PaCYCA1*, *PaCYCB1* y *PaPCNA*, que codifican dos ciclinas mitóticas y un antígeno nuclear de células proliferantes en tejidos mitóticamente activos. A contraparte está *Pafw2.2-like*, que funciona como regulador negativo de la división celular en frutos (Dahan *et al.*, 2010). Más recientemente el aislamiento del gen *FLOWERING LOCUS T-like*, *PaFT*, proporcionó evidencia de su rol en la inducción floral en la alternancia de producción (Ziv *et al.*, 2014)

El gen homólogo en aguacate *avfad9*, que codifica $\Delta 9$ -estearoil-ACP desaturasa facilita la concentración de ácidos grasos e incrementa la expresión en tratamientos con etileno. De esta manera refuerza la resistencia contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Madi *et al.*, 2003). Algo similar ocurre con *avdf12* y *avfae1*, que toman parte de la biosíntesis de

1-acetoxi-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12, 15 dieno (AFD), el cual tiene acción antifúngica (Wang *et al.*, 2004a; 2004b).

2.4. NPR1: regulador de la inmunidad en plantas

El gen *NPR1* fue descrito por primera vez en *Arabidopsis thaliana*, actuando como un importante regulador de la resistencia sistémica adquirida. Este fue caracterizado a partir de un mutante que bloquea la expresión de ácido salicílico y ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), esta mutación inhabilita la respuesta de genes *PR* (Cao *et al.*, 1994; Glazebrook *et al.*, 1996). *NPR1* requiere una señal, que puede ser ácido salicílico, INA, BTH (ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotiónico S-metil éster) o un patógeno para poder ser funcional (Vernooij *et al.*, 1995; Lawton *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2012; Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2013).

Ha sido demostrado que la sobreexpresión de *NPR1* confiere distintos grados de resistencia a diferentes patógenos (Malnoy *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015; Pant *et al.*, 2016); sin embargo, la sobreexpresión no activa la resistencia sistémica adquirida ni la expresión constitutiva de genes *PR* hasta que sea estimulado por un patógeno o un inductor bioquímico (Cao *et al.*, 1998).

2.4.1. Propiedades biológicas

La secuencia del gen *NPR1* en *Arabidopsis* se compone de cuatro exones y tres intrones (Cao *et al.*, 1997), codifica una proteína que contiene repeticiones de ankirina y un dominio BTB/POZ (*broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac /poxvirus, zinc finger*) en el extremo N-terminal, y residuos de cisteína y una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal (Kinkema *et al.*, 2000; Rochon *et al.*, 2006; Vo *et al.*, 2015).

Usando la técnica de doble híbrido en levadura se demostró la interacción de *NPR1* con diversos factores de transcripción TGA miembros de la subclase bZIP (*basic leucine zipper*) (Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Estos se unen al elemento *as-1 like* del promotor del gen *PR-1* en *A. thaliana* (Lebel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). El promotor contiene elementos de caja W, con un núcleo TGAC, que se unen a las

proteínas WRKY de unión al DNA en plantas tratadas con ácido salicílico (Yu *et al.*, 2001).

2.4.2. Mecanismos y ocurrencia

La actividad de *NPR1* esta directamente relacionada con diversas rutas de señalización inmune como la defensa basal (Dong, 2004), la resistencia sistémica adquirida (Somssich, 2003), la resistencia sistémica inducida (Pieterse *et al.*, 1998), ETI (Wu *et al.*, 2014), como receptor de la hormona de defensa ácido salicílico (Wu *et al.*, 2012) y como mediador en la comunicación entre el ácido salicílico y otras fitohormonas (Caarls *et al.*, 2015). Pero también ha sido involucrada en otras funciones tales como promover la división celular reprimiendo la endoreplicación durante el desarrollo foliar (Vanacker *et al.*, 2001), y regular la muerte celular asociada a las respuestas hipersensitivas (Aviv *et al.*, 2002; Devadas y Raina, 2002).

Algunos de los componentes de la señalización de *NPR1* y de la ruta de transducción del ácido salicílico han sido identificados mediante análisis de mutantes de *Arabidopsis*. Es el caso de Pieterse *et al.* (1998), utilizando los mutantes *jar1* (respuesta a jasmonato), *er1* (respuesta de etileno) y *npr1* (regulador de la resistencia sistémica adquirida), y en asociación con la rizobacteria, no patogénica, *Pseudomonas fluorescens*, revelaron la ruta de señalización de la resistencia sistémica inducida, controlada por *NPR1* dependiente del etileno y jasmonato e independiente del ácido salicílico.

Por otro lado, el mutante recesivo *sni1* (*supresor of npr1-1, inducible 1*) restaura la expresión inducible de los genes *PR* y la resistencia a patógenos en *npr1-1* (mutación de ácido salicílico no inducible). A su vez, el tipo silvestre *SNI1* es un represor de los genes *PR* y del rol de *NPR1*, y por tanto un regulador negativo de la resistencia sistémica adquirida (Li *et al.*, 1999).

Algo similar pasa con el dominante *ssil* (*suppressor of SA insensitivity*) que es un regulador positivo de la señal de la ruta de transducción del ácido salicílico y activa los genes *PR* dependientes del ácido salicílico. Sin embargo, es independiente de *NPR1* (Shah *et al.*, 1999), esto representa una ruta diferente de defensa. Lo contrario ocurre con

sai1 (*SA insensitive*), alélico a *npr1*, que no expresa los genes endógenos *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* en respuesta al ácido salicílico ni a otros inductores químicos. La naturaleza recesiva de esta mutación sugiere que el dominante silvestre *SAI1* actúa como regulador positivo de la vía de transducción de la señal del ácido salicílico (Shah *et al.*, 1997).

La proteína NPR1 esta presente normalmente en el citoplasma de células no estimuladas como un oligómero de gran peso molecular que es estabilizado por enlaces intermoleculares disulfuro entre las cisteínas conservadas (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). En estado de reposo, NPR1 es fosforilada en las serinas 55 y 59 (Ryals *et al.*, 1997), lo cual promueve su interacción con el factor WRKY70 que funciona como inhibidor de la expresión de genes *PR-1* (Saleh *et al.*, 2015).

El incremento de concentración de ácido salicílico resultado de la infección por patógenos provoca cambios en el potencial redox celular y activa la reducción de cisteínas mediada por tiorredoxinas y libera monómeros de NPR1 para trasladarlos al núcleo utilizando la NLS de la C-terminal (Tada *et al.*, 2008). Además de las modificaciones en las cisteínas, la fosforilación de la serina 589 mediada por SnRK2.8 (*SNF1-related kinase 2.8*) es necesaria para la importación nuclear (Lee *et al.*, 2015).

El último paso antes de la activación de los genes *PR*, es la modificación posttranscripcional de NPR1 mediada por SUMO3 (*small ubiquitin-like modifier 3*) (Saleh *et al.*, 2015). La sumolización y la fosforilación de las serinas 11 y 15 facilitan la interacción con el factor de transcripción TGA3, lo que promueve la inducción de la expresión de genes de defensa (Withers y Dong, 2016). Subsecuentemente, la NPR1 modificada es ubiquitinada y etiquetada para su degradación por el proteasoma 26S mediado por la interacción con NPR3, esto asegura que la respuesta inmune sea más fuerte pero transitoria (Spoel *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2012; Withers y Dong, 2016)

2.5. EREBP: proteína de unión al elemento de respuesta al etileno

Los factores de transcripción EREBP, actualmente llamados ERFs (*Ethylene Responsive Factors*), pertenecen a la familia de factores AP2/ERF (Nakano *et al.*, 2006). Estos tienen un dominio conservado AP2 (APETALA2) de alrededor de 60 aminoácidos

que comprende una única estructura de β -hoja de unión al DNA, sin embargo la conservación de dominios exceptuando este, es muy limitada (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995; Gutterson y Reuber, 2004). Generalmente contienen dominios que funcionan como activadores transcripcionales de la expresión de genes involucrados en resistencia a enfermedades, tolerancia a estreses abióticos, respuestas a hormonas de señalización y desarrollo de órganos (Nakano *et al.*, 2006).

2.5.1. Propiedades biológicas

EREBP es una proteína de unión al DNA específica para la secuencia de la caja GCC, que es una región conservada en genes de proteínas PR inducibles por etileno, originalmente identificada en tabaco (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). La estructura de la proteína de la unión entre la secuencia de la caja GCC y el fragmento de DNA objetivo consiste de una β -hoja de triple cadena antiparalela y una α -hélice empacada aproximadamente paralela a la β -hoja (Allen *et al.*, 1998).

2.5.2. Mecanismos y ocurrencia

La fosforilación por quinasas es una de las formas como se activan los factores AP2/ERF. Esta fosforilación resulta en cambios funcionales, localización celular y asociación con diferentes proteínas (Phukan *et al.*, 2017). Por ejemplo, MPK6, una MAP quinasa de respuesta a patógenos, fosforila *AtERF104* en respuesta al efector FLG22, a través de la señalización del etileno (Bethke *et al.*, 2009). BWMK1 actúa sobre *OsEREBP1* para activar su función de unión al DNA, especialmente al elemento de la caja GCC relacionada con genes *PR*.

Los ERF siguen la ruta de señalización del etileno. Inicialmente, el etileno es percibido por una familia de receptores localizados en endomembranas que tienen similitud con un sistema de dos componentes histidina quinasa (Mount y Chang, 2002). Cuando el etileno se une a los receptores causa la inactivación del regulador negativo CTR1 (*Constitutive Triple Response1*) (Clark *et al.*, 1998), permitiendo que la señal proceda

a través de EIN2, una proteína homóloga a la familia de transportadores de metales Nramp (Alonso *et al.*, 1999).

En ausencia de ET, CTR1 fosforila a EIN2 y previene la señalización; mientras que la inhibición de CTR1 en presencia de etileno, es señal para la escisión de EIN2 en la C-terminal y la translocación al núcleo (Ju *et al.*, 2012). EIN2 regula la cascada transcripcional que inicia con la acumulación de EIN3 y EIL1, proteínas de unión al DNA (Chao *et al.*, 1997; Kendrick y Chang, 2008). Las respuestas al etileno se activan cuando EIN3 se une al promotor de *ERF* (Solano *et al.*, 1998) que codifica los activadores transcripcionales de unión a la caja GCC de diversos genes de respuesta al etileno (Ohta *et al.*, 2000)

2.6. Genes de proteínas PRs

La expresión de genes de proteínas de estrés es un fenómeno común en plantas como reacción a condiciones desfavorables en su ambiente. Para que una proteína sea clasificada dentro del grupo de las PR, esta debe ser codificada por la planta hospedante pero inducida solo en condiciones patológicas o relacionadas (van Loon, 1990). Las condiciones patológicas incluyen todo tipo de estados de infección, no solo resistencia o respuestas hipersensitivas, en donde son muy comunes, pero también incluyen ataques parasíticos por nemátodos, insectos y herbívoros (Edreva, 2005). Por situaciones relacionadas se entiende condiciones de estrés provocadas por patógenos o por aplicación de químicos que simulan el efecto de una infección o de situaciones de estrés similares, así como inducidas por heridas (van Loon, 1990).

El contraste son aquellas proteínas estimuladas por la infección de patógenos pero que ya están presentes en plantas sanas y se someten principalmente a la modulación por factores ambientales de desarrollo, estas no son proteínas relacionadas con la patogénesis (van Loon, 1990). Estas consideraciones implican que las características de la inducción de las proteínas PR tienen prioridad sobre otras características de identificación, como las propiedades químicas o la localización celular (van Loon, 1990, 1999; Edreva, 2005).

Las proteínas PR fueron observadas por primera vez en hojas de tabaco inducidas por la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV) (van Loon y van Kammen, 1970). Generalmente son de relativo bajo peso molecular, en el rango de 5 a 75 kDa (Sels *et al.*, 2008), estables a pH bajo y altamente resistentes a proteasas endógenas (van Loon, 1985). Dependiendo de su punto isoeléctrico, pueden ser ácidas o básicas (van Loon y van Strien, 1999), esto también determina su localización, ya sea en el apoplasto o la vacuola (van Loon, 1999). Gradualmente se han ido identificando nuevas proteínas PR, a la fecha se han reconocido 17 familias en base a sus secuencias de aminoácidos, actividades enzimáticas, o sus propiedades biológicas, y numeradas en el orden que se han descubierto (Sinha *et al.*, 2014).

2.6.1. Proteínas PR-5: similar a taumatina

Debido a su similitud en secuencia con la proteína taumatina (extraída de *Thaumatococcus daniellii*) se les ha denominado proteínas similares a taumatina o TLP por sus siglas en inglés (*thaumatin-like proteins*). Permatinas, zeamatinas, osmotinas y proteínas similares a osmotina (*osmotin-like*, OLPs) son isoformas básicas (Anžlovar y Dermastia, 2003). Estas fueron identificadas por primera vez en extractos foliares de plantas infectadas con TMV (Cornelissen *et al.*, 1986).

Propiedades biológicas. De acuerdo a su peso molecular, se agrupan en dos tipos: el tipo largo (L), en el rango de 21 a 26 kD, que contiene 16 residuos de cisteína conservados; y el tipo pequeño (S), entre 16 y 17 kD y solo tienen 10 cisteínas conservadas; los puentes disulfidos entre las cisteínas mantienen estable la molécula (Liu *et al.*, 2010). En la N-terminal tienen una señal peptídica que la dirige a su maduración por la vía secretora; la osmotina y OLPs tienen en la C-terminal un propéptido que marca su dirección a la vacuola (Anžlovar y Dermastia, 2003).

La estructura se compone por tres dominios, el dominio I es un β -barril similar a lectina y forma el núcleo compacto; por un lado está el dominio II que se forma por tres α -hélices y dos β -hojas, al otro lado, el dominio III consiste de un bucle pequeño y una

β -hoja; además de una hendidura localizada entre los dominios I y II (Velazhahan *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2004; Ghosh y Chakrabarti, 2008; Liu *et al.*, 2010).

Mecanismos y ocurrencia. La regulación de la expresión de genes *PR-5* en plantas ocurre por factores como infección microbiana y elicitores patogénicos, estrés osmótico, heridas y fitohormonas (Velazhahan *et al.*, 1999). Algunas TLPs son expresadas constitutivamente obedeciendo a patrones dependientes de los órganos y etapas del desarrollo (Regalado y Ricardo, 1996; Skadsen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Van Damme *et al.*, 2002).

Las proteínas *PR-5* parecen tener diversos mecanismos anti-microbianos. Para desplegar acción antifúngica se supone que la hendidura entre los dominios I y II es necesario que sea ácida para su unión específica al receptor en la membrana de hongos (Min *et al.*, 2004). Para los hongos filamentosos, que poseen una pared celular de quitina y glucano, y oomycetos, con paredes celulares ricas en β -1,3-glucanos y celulosa, la actividad de *PR-5* se basa en la unión a los componentes de la pared celular fúngica (1, 3)- β -D-glucanos y proteínas receptoras de la membrana que llevan al incremento de la permeabilidad de la membrana y la inducción de apoptosis en el hongo (Abad *et al.*, 1996; Trudel *et al.*, 1998; Grenier *et al.*, 1999; Narasimhan *et al.*, 2001; Osmond *et al.*, 2001). También se les ha atribuido inhibición de actividades enzimáticas de hongos como xilanasa, tripsina, α -amilasa y β -glucanasa (Roberts y Selitrennikoff, 1990; Grenier *et al.*, 1999; Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001). Igualmente se ha insinuado que tiene actividad antiviral (Cornelissen *et al.*, 1986; Edelbaum *et al.*, 1991).

En estrés abiótico la expresión de TLPs muestra sobrerregulación significativa. Se acumulan en grandes niveles cuando las células empiezan a adaptarse a ambientes de bajo potencial hídrico, conjuntamente tienen roles importantes en respuestas a frío, inundación y salinidad (Barthakur *et al.*, 2001; Griffith y Yaish, 2004; Parkhi *et al.*, 2009; Misra *et al.*, 2016).

2.6.2. Proteínas PR-6: inhibidor de proteasas

Las proteínas dentro de la familia PR-6 se definen como inhibidores de proteasas (IPs) relacionadas con el "Inhibidor del tomate/papa I" (Pin1), que es el inhibidor caracterizado más extensivamente y para el cual se han encontrado muchos homólogos en diversas especies vegetales (Ryan, 1992; Heitz *et al.*, 1999). El primer miembro de la familia Pin1 fue descrito por Ryan y Balls (1962) inhibiendo quimotripsina y tripsina en papa. La clasificación de la familia PR-6 es debatible, ya que esta limitada a una sola subclase de inhibidores de serina proteasas, por lo que no todos los IPs están estrictamente clasificados como proteínas tipo PR-6 (Christeller y Laing, 2005; Sels *et al.*, 2008). Sin embargo, todos los IPs tienen actividad potencial en la defensa de plantas, todos los tipos conocidos pueden interactuar con proteasas de organismos que atacan plantas (Haq *et al.*, 2004).

Propiedades biológicas. El gen del inhibidor de proteasa I en papa y tomate comparten más del 90% de su secuencia de nucleótidos, poseen dos intrones y tres exones, codifican un pre-pro-inhibidor de 96 aminoácidos (Lee *et al.*, 1986; Cleveland *et al.*, 1987). El inhibidor Pin1 está formado por cuatro protómeros, la masa molecular de los protómeros se ha calculado en alrededor de 8 kDa, mientras que la del oligómero se ha estimado en 39 kDa, es estable al calentamiento y a la digestión proteolítica en pH neutro (Van Den Broek *et al.*, 2004). Cuenta con un sitio reactivo que muestra una gran variabilidad le permite reaccionar con diferentes serina proteasas de microbios o animales, como la tripsina, quimotripsina o subtilisina (Heitz *et al.*, 1999). Pin1 consiste de una β -hoja paralela y antiparalela de cuatro cadenas contra la cual una α -hélice se compacta para formar un núcleo hidrófobo; un bucle amplio que conecta las cadenas paralelas dos y tres de la β -hoja contiene el punto de unión con el sitio reactivo (McPhalen *et al.*, 1985; Bode y Huber, 1992). La mayoría de miembros carecen de puentes disulfuro actuando como estabilizadores, excepto por los de tomate y papa. Se cree que la estabilidad la proporcionan las uniones de hidrógeno formadas por la interacción entre la arginina y otros residuos que están a cada lado del sitio reactivo (McPhalen *et al.*, 1985; Turra y Lorito, 2011)

Mecanismos y ocurrencia. Los miembros de los inhibidores de serina proteasas han sido reportadas en una gran variedad de plantas y su acumulación demostró ser impulsada por diversos estímulos externos incluyendo heridas, alimentación por insectos e infecciones microbiales (Christeller y Laing, 2005; Habib y Fazili, 2007; Turra y Lorito, 2011). Por lo tanto, se han considerado durante mucho tiempo importantes actores de las respuestas de defensa de las plantas (Valueva y Mosolov, 2004; Tuzun y Somanchi, 2006). Mediante análisis de inmunohistoquímica a frutos de tomate silvestre se confirmó la localización y almacenamiento de Pin1 como agregados de proteínas en las vacuolas de las células del parénquima (Wingate *et al.*, 1991).

La mayoría de inhibidores de serina proteasas reaccionan siguiendo un mecanismo estándar similar a un substrato (Christeller y Laing, 2005); interactúan con sus proteasas afines a través de un bucle de unión expuesto, el complejo resultante es transitorio y colapsa con la liberación de una forma escindida de diferente estructura y estabilidad (Bode y Huber, 1992). Su actividad se debe a la habilidad de formar complejos estables con las proteasas objetivo, bloqueando, alterando o previniendo el acceso al sitio activo de la enzima para formar el núcleo hidrofóbico (Bode y Huber, 1992; Beuning *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2004).

La expresión de genes *Pin1* puede ser inducida por aplicaciones exógenas de metil jasmonato y ácido abscísico, deficiencia de agua, heladas (Wang *et al.*, 2003), heridas, ataque de insectos (Tamayo *et al.*, 2000) y nemátodos (Turra *et al.*, 2009), virus (Geoffroy *et al.*, 1990), bacterias (Pautot *et al.*, 1991) e infecciones de hongos y oomycetos (Peng y Black, 1976; Cordero *et al.*, 1994). Otros miembros de la familia *Pin1* son constitutivamente transcritos en hojas o pueden acumularse en diferentes etapas del desarrollo de frutos, órganos de reserva y órganos florales (Kuo *et al.*, 1984; Wingate *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2008; Weeda *et al.*, 2009; Turra y Lorito, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extracción de RNA total del material vegetal

Se colectaron hojas maduras y frutos inmaduros no cosechados de árboles de aguacate cv. Hass establecidos en un huerto comercial (19°26'6"N 101°52'28"O, 1610 msnm). Se muestrearon árboles sanos, árboles positivos con síntomas visibles y árboles positivos asintomáticos, previamente identificados por Vallejo-Pérez *et al.* (2015). El tejido recién colectado fue inmediatamente almacenado en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA, y así ser transportado al laboratorio para los análisis pertinentes.

Debido al alto contenido de fenoles y polisacáridos en el tejido se requirió la utilización conjunta de los métodos *PureLink® Plant RNA Reagent* (Invitrogen) y *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research) para la extracción de RNA total, de acuerdo a los manuales de cada kit.

El tejido se molió en morteros pre-enfriados hasta conseguir un polvo fino, aproximadamente 100 mg. El polvo resultante se suspendió en 0.5 mL de *PureLink® Plant RNA Reagent* en un microtubo de 0.2 mL; se agitó brevemente hasta que la muestra quedo completamente resuspendida; la muestra se incubó por 5 min a temperatura ambiente, colocando el tubo de manera horizontal para maximizar el área de contacto; la solución se clarificó centrifugando la muestra a 12,000 $\times g$ por 2 min (Hermle Labortechnik, Z 446 K, Germany); el sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio; se agregó 0.1 mL de 5 M NaCl y se mezcló en vórtex (Scientific Industries, Vortex-Genie 2 G560, USA) ; seguido se añadieron 0.3 mL de cloroformo y se agitó por inversión; consecutivamente se centrifugó a 12,000 $\times g$ por 10 min para separar las fases; la fase acuosa superior se transfirió a la columna *Zymo-Spin™ IIC Column* en un tubo colector y se centrifugó a 10,000 $\times g$ por 1 min; la columna se trasladó a un tubo colector nuevo; se añadió 400 μL de *RNA Wash Buffer* a la columna y se centrifugó (12,000 $\times g$ por 2 min).

Para eliminar el DNA genómico, se agregó directamente a la matriz de la columna una mezcla de 5 μL de *DNase I* y 75 μL de *DNA Digestion Buffer*, después se incubó a temperatura ambiente por 15 min; a continuación, se añadieron 400 μL de *Direct-zol™ RNA PreWash* a la columna y se centrifugó a 10,000 $\times g$ por 1 min, se desechó el líquido

del tubo colector y se duplicó este paso; luego se añadieron 700 μL de *RNA Wash Buffer* a la columna y se centrifugó por 1 min a 10 000 $\times g$; la columna se transfirió a un tubo nuevo libre de RNasas; para coleccionar el RNA se cargaron 25 μL de agua libre de RNasas directamente a la columna y se centrifugó a 10 000 $\times g$ por 1 min. La concentración y calidad del RNA se midieron en un NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, EUA). La integridad se verificó en gel de agarosa al 2%/TAE con cloro conforme al protocolo de Aranda *et al.* (2012).

3.2. Selección de genes

Se eligieron cuatro genes documentados relacionados con defensa en aguacate: *PaNPR1* (*Persea americana* NPR1) (Backer *et al.*, 2015); PR5 y PR6 (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013); y el gen de la proteína de unión al elemento de respuesta al etileno (*ethylene responsive element binding protein*, EREBP) (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013). El gen de actina (Reeksting *et al.*, 2014) se usó como control endógeno. Como iniciador para detección del ASBVd se empleó el diseñado por Schnell *et al.* (1997).

3.3. Análisis molecular

Para la retrotranscripción y amplificación en un solo paso se empleó la *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Para un volumen final de 10 μL por reacción se mezclaron: 1X de *Reaction Mix buffer* (contiene 0.2 mM de cada dNTP y 1.6 mM de MgSO_4), 0.2 μM de iniciador sentido, 0.2 μM de iniciador antisentido, 0.4 μL de *SuperScript® III RT/ Platinum® TaqMix*, 100 ng de RNA total y se completó el volumen con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). Las reacciones se corrieron en el termociclador (Applied Biosystems, Mod. 2720, USA) con las siguientes condiciones: síntesis de cDNA 1 ciclo de 32 min a 50 °C; desnaturalización 1 ciclo de 2 min a 94 °C; seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C (desnaturalización), 15 s con la temperatura de alineamiento calculada (TA) para cada iniciador (Cuadro 1), 15 s a 68 °C; por último un paso de elongación final por 5 min

a 68 °C. Los productos obtenidos de la RT-PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%/TAE a 80 V por 60 min. Después de la electroforesis, los geles fueron expuestos a luz UV en el fotodocumentador (Vilber Lourmat , Infinity-1000/26MX, France) para observar los productos finales.

3.4. Detección e identificación del ASBVd

La prueba de detección del patógeno se ejecutó con RT-PCR dúplex en un solo paso empleando los iniciadores del ASBVd y de actina; este último da certidumbre en la detección. La mezcla utilizada para un volumen final de 10 µL de reacción fue: 1X *Reaction Mix buffer*, 0.2 µM de ambos iniciadores, sentido y antisentido; 0.4 µL de *SuperScript® III RT/ Platinum® TaqMix*; 100 ng de RNA total y se completó el volumen con agua tratada con DEPC. Las condiciones y la mezcla de reacción para la RT-PCR de detección son exactamente iguales a las ya mencionadas.

Cuadro 1. Temperaturas de alineamiento empleadas para ejecutar la RT-PCR de un solo paso y tamaño de los productos esperados.

Iniciador	TA (°C)	Tamaño del producto (pb)
ASBVd	52*	250
Actina	57.1	103
PaNPR1	56.3	119
PR-5	55.6	171
PR-6	52	158
EREBP	61.6	96

*, Temperatura de alineamiento para la prueba de detección por RT-PCR dúplex. pb, pares de bases.

Para complementar la identificación del viroide se utilizó *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) para extraer las bandas del gel de agarosa, conforme al protocolo del fabricante. Los productos se enviaron para su secuenciación a la compañía *Macrogen Inc* (Seúl, Corea) y los resultados se introdujeron en la herramienta de alineamiento y búsqueda de secuencias BLASTn del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para su comparación con otras accesiones de la base de datos

GenBank. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa MUSCLE 3.8 (EMBL-EBI) para la identificación de residuos conservados críticos.

3.5. Cuantificación de la expresión por análisis de imagen y densitometría

El fotodocumentador *Infinity-1000/26MX* utiliza un sistema de adquisición de imágenes con una cámara digital CCD (dispositivo de carga acoplada), que permitió obtener imágenes de alta resolución y con mayor homogeneidad de iluminación para poder ser procesadas.

Utilizando el software de análisis de imágenes *ImageJ* se comparó la densidad (intensidad) de bandas en gel de agarosa a través de la visualización de la imagen digital (Ferreira y Rasband, 2012). Para poder comparar bandas en diferentes geles fue necesario calibrar a estándares conocidos; para este caso se usó la tabla calibrada de pasos *Kodak* No. 3 (disponible en línea: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration>). El procedimiento experimental de calibración de densidad óptica se hizo con las recomendaciones de Tan y Ng (2008). Las consideraciones generales y las bases técnicas para la densitometría son abordadas por Gassmann *et al.* (2009).

ImageJ genera gráficos y devuelve valores de área y porcentaje expresados como valores relativos. Las gráficas resultantes indican un perfil de intensidad que representa la intensidad media de los píxeles tomada de una región de interés constante.

3.6. Análisis estadístico

Los valores de densidades de las bandas fueron normalizados por transformación de datos $\sqrt{x+1}$ y comparados con los valores de densidad de actina y después graficados. Los gráficos resultantes indican un perfil de intensidad relativa media tomada de una región de interés constante. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de tres repeticiones. Las diferencias entre los tejidos y los árboles se analizaron por la prueba t de Student. La significancia estadística se consideró en $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento, identificación y análisis de la variación de secuencias del ASBVd

El contenido de polisacáridos, polifenoles y fenol-oxidasas en los tejidos maduros de aguacate pueden interferir en la extracción de RNA total y por consiguiente en la detección del ASBVd (Luttig y Manicom, 1999). Como resultado de conjunción de los protocolos *PureLink® Plant RNA Reagent* (Invitrogen) y *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research) para contrarrestar la composición del tejido se consiguió la extracción de RNA de buena calidad e integridad para ser utilizado en la detección del patógeno, en la síntesis de cDNA y el análisis de expresión de genes de defensa (Figura 1).

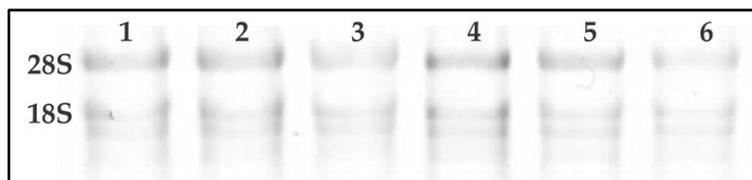


Figura 1. Prueba de integridad del RNA total. La prueba de integridad en las muestras de RNA es indispensable para el análisis de expresión de genes. Los indicadores de calidad de la extracción de RNA total son las dos subunidades del RNA ribosomal, esto es imprescindible para lograr ensayos exitosos de PCR y sus variantes. Los carriles 1-3 corresponde a tejido foliar y los carriles 4-6 a frutos.

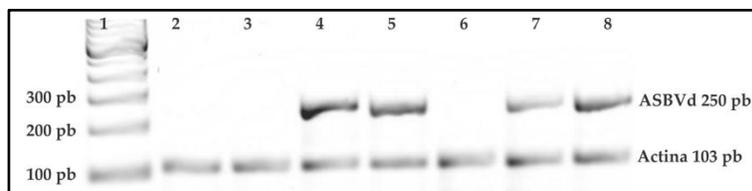


Figura 2. Detección del viroide de la mancha de sol en aguacate. Productos amplificados por RT-PCR dúplex de un solo paso. Los tejidos positivos para

la infección con ASBVd muestran dos productos, el que pertenece al viroide de 250 pb y el de la amplificación del gen de actina de 103 pb. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb. Los carriles 4 y 7 son muestras de tejido de árboles asintomáticos, hoja y fruto respectivamente; mientras que los carriles 5 y 8 provienen de tejido de árboles con síntomas visibles, hoja y fruto respectivamente. Los tejidos procedentes de árboles sanos solo expresan la banda de actina, los carriles 2 y 3 son de tejido foliar, y el carril 6 es de fruto.

El método de identificación del ASBVd por RT-PCR dúplex de un solo paso y el posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa 2%/TAE con los iniciadores específicos diseñados por Schnell *et al.* (1997), derivaron en productos de aproximadamente 250 pb de peso, tamaño coincidente con el patógeno en cuestión, y además esta banda está ausente en tejido sano. La amplificación del gen de actina que sirvió para comprobar el acierto en la reacción y dar certeza de la detección, se muestra como un producto de 103 pb que aparece en todas las muestras analizadas (Figura 2).

Las cadenas de nucleótidos producto de la secuenciación de nueve diferentes muestras se introdujeron en el programa BLASTn para su comparación con las accesiones de la base de datos GenBank del NCBI. Todas las secuencias invariablemente tuvieron tres coincidencias principales correspondientes con aislamientos del ASBVd reportados en zonas productoras de aguacate (Beltrán-Peña *et al.*, 2014), y exhiben un elevado porcentaje de identidad de nucleótidos y valores E (valores de expectación) importantes (Cuadro 2).

El valor E representa el número de diferentes alineaciones con puntuaciones iguales o menores de un límite predefinido que se espera ocurra en una búsqueda en la base de datos, que es una cantidad estadística (Karlin y Altschul, 1990). Cuanto menor sea el valor de E, más significativo será el puntaje y la alineación. La identidad se define

como la medida en que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en el alineamiento y se expresa como porcentaje.

Cuadro 2. Valores E y porcentaje de identidad de nueve secuencias obtenidas de la banda de 250 pb en muestras de árboles infectados con ASBVd.

Accesión ID	KF562705.1		KF562706.1		KF562704.1	
	Valor E	Identidad	Valor E	Identidad	Valor E	Identidad
ASBVd_F_1	3e-75	98%	2e-73	97%	7e-67	95%
ASBVd_F_2	7e-80	93%	3e-78	92%	1e-71	90%
ASBVd_F_3	1e-96	98%	1e-91	96%	3e-88	95%
ASBVd_F_4	5e-91	96%	2e-89	95%	1e-82	93%
ASBVd_F_5	1e-87	95%	5e-86	95%	2e-79	93%
ASBVd_F_6	5e-81	95%	1e-77	94%	1e-72	93%
ASBVd_F_7	5e-81	95%	1e-77	94%	1e-72	93%
ASBVd_F_8	2e-90	97%	2e-85	95%	9e-84	95%
ASBVd_F_9	9e-94	97%	9e-89	96%	2e-85	95%

La accesión # KF562705.1, que se identifica como el aislamiento Uruapan-1 del ASBVd (Beltrán-Peña *et al.*, 2014), mantuvo los valores E y la identidad más significativos al ser comparadas con las nueve secuencias. El otro par de accesiones también tiene gran similitud con las secuencias aquí presentadas. Sin embargo, no está especificado si estas accesiones corresponden a aislamientos sintomáticos o asintomáticos.

Para el análisis de alineamiento de múltiples secuencias se empleó la herramienta informática MUSCLE 3.8 (EMBL-EBI) y como referencia se usó la accesión # KF562705.1 (Figura 3). Este alineamiento múltiple permite advertir regiones conservadas entre todas las secuencias evaluadas (Edgar, 2004).

```

KF562705.1      AGTCTCGCAAGGTTTATTCCTCTATCTTCATTGTTTTTTTTACAAAATCTTGTTTATTAGA
ASBVd_F_1      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_7      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_8      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_3      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_9      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_2      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_6      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_4      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
ASBVd_F_5      AACCTTGCGGAGACTCA-----TCAGTGTTCCTCC----CATCTT-TCCCTGAAG
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 3. Alineamiento de múltiples secuencias. Se usó MUSCLE 3.8 (EMBL-EBI) y como referencia la accesión # KF562705.1. (*) Indica los nucleótidos conservados en todas las secuencias analizadas. (-) Es un espacio introducido en el alineamiento para compensar las inserciones o deleciones en una secuencia relativa a otra. En negritas la región conservada a la que se refiere como determinante para la expresión de síntomas por la inserción de una U (115-118).

La secuencia referente de 247 pb del ASBVd (GenBank accesión # J02020) se compone de 68 A (27.5%), 43 C (17.4%), 51 G (20.6%), y 85 U (34.4%), con un contenido de G+C de 38% (Flores *et al.*, 2000; Symons, 1981). Estas proporciones son muy similares a la accesión KF562705.1 de 249 nucleótidos, 71 A (28.5%), 40 C (16%), 51 G (20.4%), 87 T (34.9%), y contenido G+C de 36.5%. A esta secuencia se le han sumado numerosas variantes de aislamientos de regiones geográficas distintas (De la Torre *et al.*, 2009; Pallás *et al.*, 1988; Rakowski y Symons, 1989; Schnell *et al.*, 2001). Estas variaciones se han asociado a síntomas diferenciales; en la clorosis foliar predominan secuencias de 249 a 250 nucleótidos, donde también es alta la concentración del viroide, mientras que los tejidos que presentan variegado y los asintomáticos portadores se asocian a secuencias de 247 a 248 nucleótidos (Semancik y Szychowski, 1994).

La variante asintomática toma relevancia debido a que su producción es continua en todo el hospedante (Semancik y Szychowski, 1994); esto es importante particularmente para la transmisión por semilla (Wallace, 1967), y a pesar de que no se presentan síntomas visibles, ésta se caracteriza por una marcada reducción en la producción de fruta (Desjardins, 1987).

Según un mecanismo supuesto, la variante asintomática puede dar lugar a la reactivación de la variante sintomática por el alargamiento de su bucle terminal derecho (Semancik y Szychowski, 1994). Sin embargo, existen aislamientos hechos a partir de tejido verde con los mismos cambios en el bucle terminal derecho que aquellos

aislamientos de tejidos con síntomas, mas específicamente se atribuye a la inserción de una U entre los pares 115 y 118 como responsable de la condición de clorosis (Schnell *et al.*, 2001).

4.2. Evaluación de la expresión de genes de defensa

Para caracterizar las diferencias en la expresión de genes relacionados con defensa se detectaron productos mediante amplificación por RT-PCR. Los genes expresaron en las tres condiciones de árboles con las que se trabajó. Los productos de la amplificación separados por electroforesis se presentan en la Figura 4. Como ocurre expresión constitutiva en los tejidos sanos, aquí se decidió comparar el efecto de la infección del ASBVd entre las dos condiciones patológicas de árboles sintomáticos y asintomáticos con respecto al sano.

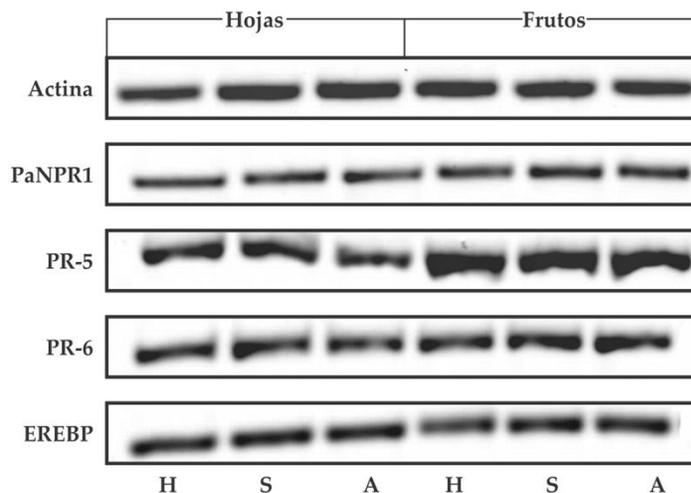


Figura 4. Productos de la amplificación de genes de defensa. Los primeros tres carriles corresponden a tejido foliar, los tres restantes son de tejido de frutos. (H) sano, (S) sintomático, (A) asintomático.

4.3. Análisis de densitometría

El efecto de la infección del ASBVd en la expresión de genes de defensa fue evaluada por densitometría utilizando ImageJ. Las imágenes evaluadas son de los

productos en electroforesis obtenidas mediante el fotodocumentador. Los datos de área y porcentaje que arroja ImageJ se usaron para obtener densidades relativas de cada banda; los ajustes se hicieron tomando como referencia el gen de actina. Los datos de densidades ajustadas se transformaron para realizar el análisis estadístico t de Student. Se compararon las muestras sanas vs. sintomáticas y asintomáticas; y sintomáticas vs. asintomáticas. En la Figura 5 se presentan gráficas de los promedios de densidades relativas ajustadas para cada gen diferencialmente expresado. Es conveniente recordar que esta densidad es la cantidad relativa de amplificación del DNA, considerando que se usó la misma cantidad de RNA (calculada en el espectrofotómetro) en la reacción de RT-PCR, lo que quiere decir que es la cuantificación de la expresión relativa de cada gen.

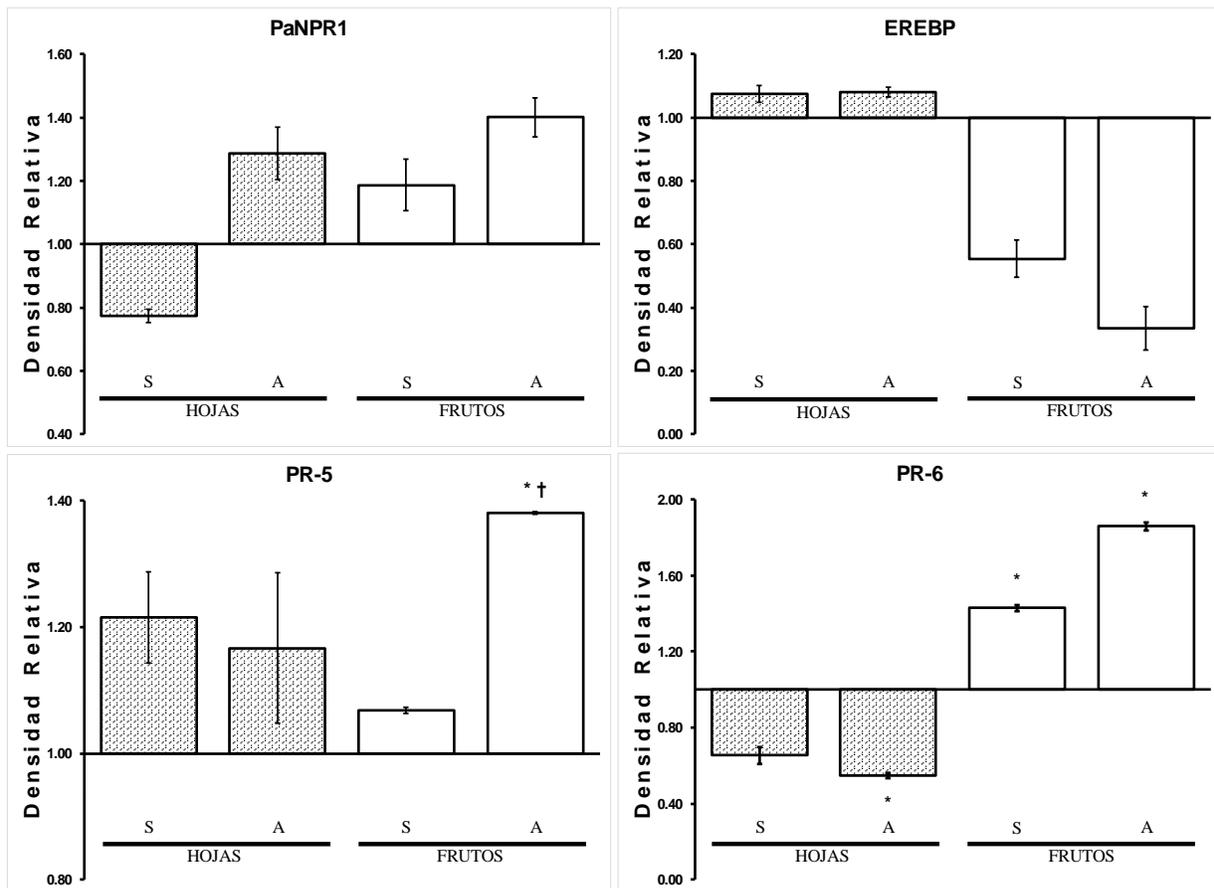


Figura 5. Análisis cuantitativo de las intensidades de los productos de la RT-PCR de los genes relacionados con defensa. Se muestran los promedios de las densidades relativas ajustadas, los cambios en la intensidad son negativos o positivos a partir del valor de la expresión basal asignada como 1. La línea

vertical sobre cada barra representa el error estándar. S, tejido sintomático; A, tejido asintomático; *, diferencia significativa con respecto al sano; †, diferencia significativa entre sintomático y asintomático.

El gen del cofactor *PaNPR1* y del factor *EREBP* no mostraron diferencias significativas en la expresión diferencial entre los árboles infectados, sintomáticos y asintomáticos, con respecto a la expresión basal en los tejidos sanos. Ambas proteínas son reconocidas por actuar arriba en la ruta de expresión de genes *PR*, incluyendo *PR-5* y *PR-6*. Sin embargo, parecen no actuar sobre la expresión de estos genes.

El comportamiento de *PR-5* en el fruto asintomático es muy interesante, porque sufre una sobrerregulación que es significativamente diferente a la de los frutos sintomáticos y a la expresión basal, mientras que en los frutos con síntomas no hubo diferencias. Esto mismo ocurrió con el tejido foliar infectado.

La expresión de *PR-6* en frutos infectados tuvo regulación positiva, y aunque se aprecia un incremento marcado en frutos asintomáticos, no existe diferencia significativa con los frutos sintomáticos. El tejido foliar sufre regulación negativa con efectos significativos en los árboles asintomáticos.

5. DISCUSIÓN

La resistencia fitopatogénica se fundamenta en el rápido despliegue de una respuesta de defensa de múltiples componentes (Spoel y Dong, 2012). Estas respuestas incluyen la inducción de la expresión de genes relacionados con defensa y señales que pueden guiar a un tipo de resistencia de amplio espectro conocido como resistencia sistémica adquirida (Kachroo y Robin, 2013). Algunos avances se han logrado en la biología de la interacción de viroides con sus hospederos desde las estructuras determinantes para la patogénesis hasta la defensa de la planta para evitar la infección,

y cómo el viroide evita esta defensa (Flores *et al.*, 2005a; Ding, 2009; Navarro *et al.*, 2012; Kovalskaya y Hammond, 2014).

En el presente estudio examinamos el efecto de la infección de ASBVd en aguacate. El objetivo es diferenciar valores de expresión de genes de defensa en aguacate para conocer más sobre los mecanismos de defensa y las rutas de infección que sigue el ASBVd. Para este fin se tomaron como base genes que han sido estudiados en la infección de otros fitopatógenos en aguacate, bajo tres situaciones patológicas, árboles sanos, árboles infectados sintomáticos y árboles infectados asintomáticos.

5.1. Análisis de las secuencias aisladas

Se ha predicho una estructura similar a una varilla para el ASBVd (Symons, 1981), sin embargo, dado que posee RNA de ambas polaridades, con formas multiméricas en la cadena (+), y monoméricas y diméricas en la cadena (-) (Hutchins *et al.*, 1985), se han propuesto modelos de estructuras secundarias para cada polaridad basados en diferencias biofísicas que existen entre ambas, una estructura de varilla en la cadena ASBVd (+) y una estructura ramificada en la cadena ASBVd (-), lo cual se especula podría jugar distintos roles durante el ciclo de vida del viroide (Delan-Forino *et al.*, 2014).

Pero, en el trabajo de Giguère *et al.* (2014), no encontraron grandes diferencias entre ambas polaridades, y reportaron una estructura similar a una varilla que incluye un gran bucle en el dominio izquierdo, un bucle central con nucleótidos conservados y un bucle terminal relativamente grande en el dominio derecho; la única diferencia estaba en la cadena ASBVd (-) donde el dominio central aparenta más un dominio de doble cadena.

Otra estructura importante en los miembros de la familia *Avsunviroidae* son los ribozimas de cabeza de martillo, estructura que adoptan en las cadenas de ambas polaridades para catalizar la autoescisión durante la replicación (Flores *et al.*, 2000; 2005b). Esta estructura se forma por un núcleo central de secuencias conservadas rodeada por tres tallos usualmente cubiertos por bucles cortos (Flores *et al.*, 2009).

Delan-Forino *et al.* (2014) sugieren la existencia de una interacción conocida como *kissing-loop* entre los dos bucles terminales de la cadena ASBVd (-) y que es conservada entre algunas variantes, en la que la interacción se da entre los nucleótidos 5'₈₂AAAAA₈₆3' y 5'₁₈₉UUUUU₁₉₃3'. Cuando examinaron el emparejamiento de bases entre 96 secuencias diferentes de ASBVd, 90 variantes incluían un tramo de seis adeninas consecutivas y seis uracilos consecutivos, involucrados en la interacción *kissing-loop*, de las seis restantes, dos presentan un tramo de cinco en lugar de seis uracilos, y otro tiene G en el tramo de A y están identificados como árboles asintomáticos; los dos restantes muestran importantes deleciones y también se identifican como árboles asintomáticos, aunque no descartan que estas dos últimas representen viroides defectuosos.

En otros miembros de la familia *Awsunviroidae*, como *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) se ha identificado un tetrabucle GAAA en las posiciones 82 a 85 característico de la variante asintomática y determinante en la patogenicidad; en la variante sintomática este tetrabucle se forma por UUUC (De La Peña y Flores, 2002). Malfitano *et al.* (2003) diferenciaron dos grupos de variantes en el *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), el primero de 336-338 nt de tamaño, típico de las variantes asintomáticas y la inductora de mosaico, el segundo de 348-351 nt debido a la inserción de un fragmento de 12-13 nt que es determinante en la inducción de calicó, considerado un síntoma más severo.

Estos autores han coincidido en algunos puntos, la secuencia, más que las estructuras que adoptan los viroides, y la conservación de estos motivos son factores categóricos de la patogenicidad y la aparición de síntomas; además, las variantes asintomáticas pueden evolucionar a una variante sintomática, y que hasta se les pudiera considerar como aislamientos latentes; y por último, la aparición de síntomas no es consecuencia de los altos niveles que puede llegar a alcanzar la acumulación de viroides en la planta hospedante (De La Peña y Flores, 2002; Malfitano *et al.*, 2003; Schnell *et al.*, 2001; Semancik y Szychowski, 1994).

Aun conociendo estos contextos, no podemos asegurar que las secuencias que aislamos y presentamos en este trabajo sean consistentes con estas condiciones para poder explicar que se trata de variantes sintomáticas o asintomáticas, pues se necesita un análisis más refinado donde incluso se puedan comparar las estructuras secundarias que formarían.

5.2. *PaNPR1* en respuesta a la infección del ASBVd

Los resultados hacen constar que existe expresión constitutiva de *PaNPR1* en los tejidos infectados. Sin embargo, la expresión constitutiva no es capaz por sí sola de inducir la expresión de genes *PR* sin la presencia de ácido salicílico (Meur *et al.*, 2008). En las hojas de árboles asintomáticos y en frutos sintomáticos y asintomáticos la expresión de *PaNPR1* fue regulada positivamente. Sin embargo, a pesar de que NPR1 puede inducir la expresión de *PR-5* (Shah *et al.*, 2001), nuestros resultados muestran que ante la infección por ASBVd, los cambios de expresión de *PR-5* no son inducidos por *PaNPR1*, debido a que los niveles de expresión de éste no muestran diferencias significativas con respecto a la expresión basal.

Backer *et al.* (2015) reportaron expresión constitutiva de *PaNPR1* en raíces, tallos, hojas y frutos; pero los niveles basales fueron más altos en tejidos maduros que en jóvenes, y la expresión es más alta en hojas que en frutos inmaduros; además, y a diferencia del conocimiento que se tiene donde el ácido salicílico es activador de NPR1, ellos encontraron una baja en la regulación de *PaNPR1* en el tratamiento con ácido salicílico a las 12 h después de la aplicación, lo que sugiere una función alternativa en las respuestas de defensa.

5.3. Factor de transcripción ERF

Los viroides son capaces de inactivar algunos FT, incluyendo EREBP, generalmente al suprimir las vías de regulación de los mRNA asociados a estos factores (Diermann *et al.*, 2010; Owens *et al.*, 2012; Matoušek *et al.*, 2015; Katsarou *et al.*, 2016). En

los frutos infectados en esta investigación ocurre una regulación negativa, pero estadísticamente no existieron diferencias.

EREBP es un factor de transcripción que tiene un rol crucial en la respuesta de las plantas a estrés de patógenos, al regular la expresión de genes relacionados con la patogénesis de manera dependiente del etileno (Ohme-Takagi *et al.*, 2000). A pesar de que el etileno es una hormona muy común que puede simular el ataque de patógenos y promover la expresión de algunas proteínas PR, este juega un rol limitado en el desarrollo de síntomas inducido por viroides (Hu *et al.*, 2011), lo cual es consistente con los resultados obtenidos.

5.4. Genes de proteínas PR

Con respecto a la inducción de los genes *PR-5* y *PR-6*, los resultados obtenidos permiten suponer que el mecanismo que activa la expresión de genes PR funciona como un set de genes coordinado, no específico, que solo varía en magnitud pero que puede llegar a detener la infección primaria (Rodrigo *et al.*, 1991; Fister *et al.*, 2016).

El comportamiento de la expresión de *PR-5* en los frutos asintomáticos fue particularmente notable: estos se diferenciaron de los demás tejidos por una expresión elevada, apuntando hacia una respuesta de defensa más activa. La inducción de los genes *PR-5* puede ocurrir por la acción de ácido abscísico, etileno, salicilato, metil jasmonato o algunos elicitores (Velazhahan *et al.*, 1999). Es así, como inferimos que en la infección con ASBVd la inducción de *PR-5* en frutos asintomáticos proviene de la activación por la señalización de otro mensajero diferente al etileno, en consecuencia a la baja regulación que encontramos del factor de transcripción EREBP.

La acumulación vacuolar de estas proteínas ya se ha demostrado en otras infecciones causadas por viroides, estas se asocian con densos cuerpos de inclusión causando síntomas foliares (Rodrigo *et al.*, 1991, 1993). La función biológica de las proteínas PR-5 en infecciones fúngicas se basa en la unión a β -glucanos y envuelve la permeabilización de la membrana (Osmond *et al.*, 2001); pero no todas las PR-5 son capaces de unirse a estos glucanos y probablemente están involucradas en

reconocimiento (Osmond *et al.*, 2001). La acumulación en la vacuola, sugiere que su presencia es complementar un mecanismo sinérgico de defensa con otras PR (Rodrigo *et al.*, 1993).

La expresión de *PR-6* también resulta interesante, pues los tejidos infectados manifiestan una regulación positiva, similar a lo que ocurrió con *PR-5*. Las proteínas *PR-6* son miembros del grupo de inhibidores de proteasas reportadas en una gran variedad de plantas en respuesta a diversos estímulos externos incluyendo heridas, alimentación por insectos e infecciones microbiales (Christeller y Laing, 2005; Habib y Fazili, 2007; Turra y Lorito, 2011).

La expresión de *PR-6* puede ser regulada por etileno y activada en hojas durante la maduración de frutos (Margossian *et al.*, 1988); también puede ser inducida por aplicaciones exógenas de metil jasmonato y ácido abscísico (Wang *et al.*, 2003). De acuerdo con la escasa expresión de *EREBP* en los frutos infectados, la expresión de *PR-6* en frutos asintomáticos parece relacionada con la inducción por ácido jasmónico o a través de una ruta alterna (Koiwa *et al.*, 1997).

Gadea *et al.* (1996) describieron la expresión ectópica de un miembro de los inhibidores de proteasas en plantas de tomate infectadas con un viroide y estimulada con etefón, un precursor del etileno, aunque no relacionaron estos efectos con el etileno sino con un efecto adicional del etefón independiente del etileno; pero mejora la sensibilidad al ácido salicílico para la activación de genes de defensa (Lawton *et al.*, 1994), aunque la inducción de inhibidores de proteasas no se ha asociado al ácido salicílico.

Djami-Tchatchou *et al.* (2013) no encontraron diferencia significativa en la tasa de expresión de *PR-5* por la infección de *C. gloeosporioides* entre frutos de aguacate en respuestas tempranas y tardías y el testigo, al igual que ocurrió en nuestro análisis de la infección postsintomática de ASBVd en el tejido foliar sintomático. La tasa de expresión reportada en *PR-6*, en las mismas condiciones, es significativamente elevada en los frutos evaluados en infección tardía.

La activación de proteínas relacionadas con la patogénesis constituye el último paso en las respuestas de defensa a patógenos. El mecanismo por el que estas proteínas son capaces de retardar la aparición de síntomas aún permanece elusivo, considerando que la cascada de eventos que lleva a la aparición de síntomas provocados por viroides se sigue estudiando. Este estudio establece una diversificación en las rutas de defensa del aguacate que son inducidas por la enfermedad de la mancha de sol y su agente causante. Resultaría interesante comparar la expresión de un tándem mayor de genes PR para destacar algunos de éstos para entender las rutas de defensa involucradas.

6. CONCLUSIONES

Es posible resaltar algunos puntos importantes en estas comparaciones: 1) el tejido foliar y el tejido de frutos tienen diferentes mecanismos de respuesta a la infección de ASBVd mediante los genes de defensa evaluados en este trabajo; 2) los cambios más significativos en la expresión se dan en frutos asintomáticos; 3) las diferencias entre las variantes sintomáticas y asintomáticas se entienden por ser representativas en el caso de expresión de *PR-5* en frutos; sin embargo, ocurre regulación positiva en frutos infectados; 4) la expresión de *PR-6* en los frutos infectados también es significativamente mayor a la expresión del control sano, pero sin significancia entre el sintomático y asintomático.

7. LITERATURA CITADA

- Abad, L. R., M. P. D'Urzo, D. Liu, M. L. Narasimhan, M. Reuveni, J. K. Zhu, X Niu, N. K. Singh, P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* 118: 11-23.
- Allen, M. D., K. Yamasaki, M. Ohme-Takagi, M. Tateno, and M. Suzuki. 1998. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of

the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal* 17: 5484–5496.

Alonso, J. M., T. Hirayama, G. Roman, S. Nourizadeh, and J. R. Ecker. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148–2152.

Anžlovar, S., and M. Dermastia. 2003. The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biology* 5: 116–124.

Arana, J., J. Bijman, O. Omta, and A. Oude-Lansink. 2015. A case study of the Mexican avocado industry based on transaction costs and supply chain management practices. *Economía: Teoría Y Práctica* 42: 137–165.

Aranda, P. S., D. M. LaJoie, and C. L. Jorcyk. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33: 366–369.

Aviv, D. H., C. Rustérucci, B. F. Holt, R. Dietrich, J. Parker, and J. L. Dangl. 2002. Runaway cell death , but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *The Plant Journal* 29: 381–391.

Backer, R., W. Mahomed, B. J. Reeksting, J. Engelbrecht, E. Ibarra-Laclette, and N. N. van den Berg. 2015. Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana* (Mill.). *Frontiers in Plant Science* 6: 300.

Barrera, C., y H. Rojas. 2007. Inicio de la erradicación del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) y *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) en palto. *In: Proceedings VI World Avocado Congress*. Viña del Mar, Chile. pp. 3

Barthakur, S., V. Babu, And K. C. Bansal. 2001. Over-expression of osmotin induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 10: 31–37.

Bellincampi, D., F. Cervone, and V. Lionetti. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 5: 228.

Beltrán-Peña, H., J. Soria-Ruiz, D. Téliz-Ortiz, D. L. Ochoa-Martínez, C. Nava-Díaz, C., y S. Ochoa-Ascencio. 2014. Detección satelital y molecular del viroide de la

- mancha de sol del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd). *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 21–29.
- Bergh, B., and N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135–146.
- Bethke, G., T. Unthan, J. F. Uhrig, Y. Pöschl, A. A. Gust, D. Scheel, and J. Lee. 2009. Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 8067–8072.
- Beuning, L. L., T. W. Spriggs, and J. T. Christeller. 1994. Evolution of the proteinase inhibitor I family and apparent lack of hypervariability in the proteinase contact loop. *Journal of Molecular Evolution* 39: 644–654.
- Bode, W., and R. Huber. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry* 204: 433–451.
- Bol, J. F., H. J. M. Linthorst, and B. J. C. Cornelissen. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus-infection. *Annual Review of Phytopathology* 28: 113–138.
- Bost, J., N. Smith, and J. Crane. 2013. History, distribution and uses. *In*: Schaffer, B., B. Wolstenholme, and A. Whiley (eds.). *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CAB International, Oxfordshire, UK. pp. 10–30
- Bozak, K. R., H. Yu, R. Sirevåg, and R. E. Christoffersen. 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 3904–3908.
- Brauer, E. K., N. Ahsan, R. Dale, N. Kato, A. E. Coluccio, M. A. Piñeros, L. V. Kochian, J. J. Thelen, and S. C. Popescu. 2016. The raf-like kinase ILK1 and the high affinity K⁺ transporter HAK5 are required for innate immunity and abiotic stress response. *Plant Physiology* 171: 1470–1484.
- Caarls, L., C. M. J. Pieterse, and S. C. M. Van Wees. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science* 6: 170.

- Camejo, D., A. Guzmán-Cedeño, and A. Moreno. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 10–23.
- Cao, H., S. A. Bowling, S. Gordon, and X. Dong. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 6: 1583–1592.
- Cao, H., J. Glazebrook, J. D. Clarke, S. Volko, and X. Dong. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57–63.
- Cao, H., X. Li, and X. Dong. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 6531–6536.
- Cass, L. G., K. A. Kirven, and R. E. Christoffersen. 1990. Isolation and characterization of a cellulase gene family member expressed during avocado fruit ripening. *Molecular & General Genetics* 223: 76–86.
- Chanderbali, A. S., D. E. Soltis, P. S. Soltis, B. N. Wolstenholme. 2013. Taxonomy and botany. *In: Schaffer, B., B. Wolstenholme, and A. Whiley (eds.). The Avocado: Botany, Production and Uses.* CAB International, Oxfordshire, UK. pp. 31–50
- Chao, Q., M. Rothenberg, R. Solano, G. Roman, W. Terzaghi, and J. R. Ecker. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133–1144.
- Chernys, J. T., J. A. Zeevaart. 2000. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* 124: 343–353.
- Chisholm, S. T., G. Coaker, B. Day, and B. J. Staskawicz. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814.
- Christeller, J., and W. Laing. 2005. Plant serine proteinase inhibitors. *Protein and Peptide Letters* 12: 439–447.

- Christoffersen, R. E., M. L. Tucker, and G. G. Laties. 1984. Cellulase gene expression in ripening avocado fruit: the accumulation of cellulase mRNA and protein as demonstrated by cDNA hybridization and immunodetection. *Plant Molecular Biology* 3: 385–391.
- Christoffersen, R. E., E. Warm, and G. G. Laties. 1982. Gene expression during fruit ripening in avocado. *Planta* 155: 52–57.
- Cipollini, D., D. Walters, C. Voelckel. 2014. Costs of resistance in plants: from theory to evidence. *In: Voelckel C., and G. Jander (eds.). Annual Plant Reviews Vol. 47. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 263–308.*
- Clark, K., P. Larsen, X. Wang, and C. Chang. 1998. Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 5401–5406.
- Cleveland, E., R. W. Thornburg, and C. A. Ryan. 1987. Molecular characterization of a wound-inducible inhibitor I gene from potato and the processing of its mRNA and protein. *Plant Molecular Biology* 8: 199–207.
- Conrath, U., G. J. M. Beckers, C. J. G. Langenbach, and M. R. Jaskiewicz. 2015. Priming for enhanced defense. *Annual Review of Plant Biology* 53: 97–119.
- Cordero, M. J., D. Raventós, and B. San Segundo. 1994. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *The Plant Journal* 6: 141–150.
- Cornelissen, B. J. C., R. A. H. van Huijsduijnen, and J. F. Bol. 1986. A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature* 321: 531–532.
- Couto, D., R. Niebergall, X. Liang, C. A. Bücherl, J. Sklenar, A. P. Macho, V. Ntoukakis, P. Derbyshire, D. Altenbach, D. Maclean, S. Robatzek, J. Uhrig, F. Menke, J. M. Zhou, and C. Zipfel. 2016. The *Arabidopsis* protein phosphatase PP2C38 negatively regulates the central immune kinase BIK1. *PLoS Pathogens* 12(8): e1005811.

- Dagdas, Y. F., K. Beihaj, A. Maqbool, A. Chaparro-Garcia, P. Pandey, B. Petre, N. Tabassum, N. Cruz-Mireles, R. K. Hughes, J. Sklenar, J. Win, F. Menke, K. Findlay, M. J. Banfield, S. Kamoun, and T. O. Bozkurt. 2016. An effector of the irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *eLife* 5: 10856.
- Dahan, Y., R. Rosenfeld, V. Zadiranov, and V. Irihimovitch. 2010. A proposed conserved role for an avocado fw2.2-like gene as a negative regulator of fruit cell division. *Planta* 232: 663–676.
- Dann, E., R. Ploetz, L. Coates, and K. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases. *In*: Schaffer, B., B. Wolstenholme, and A. Whiley (eds.), *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CAB International, Oxfordshire, UK. pp. 380–422
- De La Peña, M., and R. Flores. 2002. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *Journal of Molecular Biology*. 321: 411–421.
- De la Torre, R., D. Téliz-Ortiz, V. Pallás, and J. Sánchez-Navarro. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacan, Mexico. *Plant Disease* 93: 202.
- Degrave, A., S. Siamer, T. Boureau, and M. A. Barny. 2015. The AvrE superfamily: ancestral type III effectors involved in suppression of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Molecular Plant Pathology* 16: 899–905.
- Delan-Forino, C., J. Deforges, L. Benard, B. Sargueil, M. C. Maurel, and C. Torchet. 2014. Structural analyses of *Avocado sunblotch viroid* reveal differences in the folding of plus and minus RNA strands. *Viruses* 6: 489–506.
- Delaunoy, B., P. Jeandet, C. Clement, F. Baillieul, S. Dorey, and S. Cordelier. 2014. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Frontiers in Plant Science* 5: 249.
- Desjardins, P. 1987. Avocado sunblotch. *In*: Diener, T. O. (ed.). *The Viroids*. Plenum Press New York. pp. 299–313

- Desjardins, P., P. Saski, and R. Drake. 1987. Chemical inactivation of *Avocado sunblotch viroid* on pruning and propagation tools. *California Avocado Society Yearbook* 71: 259–262.
- Després, C., C. DeLong, S. Glaze, E. Liu, and P. R. Fobert. 2000. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell* 12: 279–290.
- Devadas, S. K., and R. Raina. 2002. Hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis* hrl1 mutant. *Plant Physiology* 128: 1234–1244.
- Diermann, N., J. Matoušek, M. Junge, D. Riesner, and G. Steger. 2010. Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in infected tomato. *Biological Chemistry* 391: 1379–1390.
- Dietz, K. J., M. O. Vogel, and A. Viehhauser. 2010. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* 245: 3–14.
- Ding, B. 2009. The biology of viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 47: 105–131.
- Djami-Tchatchou, A. T., C. J. Straker, and F. Allie. 2012. 454 sequencing for the identification of genes differentially expressed in avocado fruit (cv. Fuerte) infected by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology* 160: 449–460.
- Djami-Tchatchou, A. T., F. Allie, C. J. Straker. 2013. Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *South African Journal of Botany* 86: 92–100.
- Dodds, P. N., and J. P. Rathjen. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539–548.
- Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 547–552.

- Dopico, B., A. L. Lowe, I. D. Wilson, C. Merodio, and D. Grierson. 1993. Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Molecular Biology* 21: 437–449.
- Dreher, M. L., and A. J. Davenport. 2013. Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53: 738–750.
- Duester, K. C. 2001. Avocado fruit is a rich source of β -sitosterol. *Journal of the American Dietetic Association* 101: 404–405.
- Durian, G., M. Rahikainen, S. Alegre, M. Brosché, and S. Kangasjärvi. 2016. Protein phosphatase 2A in the regulatory network underlying biotic stress resistance in plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 812.
- Ebrahim, S., K. Usha, and B. Singh. 2011. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism age-related pathogen resistance. *In: Méndez-Vilas A. (ed.), Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Formatex Research Center, Badajoz, Spain. pp. 1043–1054.
- Edelbaum, O., N. Sher, M. Rubinstein, D. Novick, N. Tal, M. Moyer, E. Ward, J. Ryals, and I. Sela. 1991. Two antiviral proteins, gp35 and gp22, correspond to β -1,3-glucanase and an isoform of PR-5. *Plant Molecular Biology* 17: 171–173.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31: 105–124.
- Ellis, J. G. 2016. Integrated decoys and effector traps: how to catch a plant pathogen. *BMC Biology* 14: 13.
- Engelbrecht, J., and N. Van Den Berg. 2013. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal of Science* 109: 11–12.
- Ferreira, T., W. Rasband. 2012. ImageJ user guide. Disponible en línea: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>

- Fister, A. S., L. C. Mejia, Y. Zhang, E. A. Herre, S. N. Maximova, and M. J. Guiltinan. 2016. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC Genomics* 17: 363.
- Flores, R., J. A. Daròs, and C. Hernández. 2000. Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research* 55: 271–323.
- Flores, R., M. E. Gas, D. Molina-Serrano, M. A. Nohales, A. Carbonell, S. Gago, M. De la Peña, and J. A. Daròs. 2009. Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses* 1: 317–334.
- Flores, R., C. Hernández, E. Martínez de Alba, J. A. Daròs, and F. Di Serio. 2005a. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 117–139.
- Flores, R., J. A. Navarro, M. De La Peña, B. Navarro, S. Ambrós, and A. Vera. 2005b. Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. *Biological Chemistry* 380: 849–854.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011a. Current situation and medium-term outlook for tropical fruits. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/meeting/028/ma937e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011b. Tropical fruits compendium. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/meeting/022/am481t.pdf>
- Fu, Z. Q., and X. Dong. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839–863.
- Fu, Z. Q., S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S. H. Spoel, Y. Tada, N. Zheng, and X. Dong. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486: 228–232.

- Gadea, J., M. E. Mayda, V. Conejero, P. Vera. 1996. Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 409-415.
- Galindo-Tovar, M. E., N. Ogata-Aguilar, A. M. Arzate-Fernández. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 441-450.
- García-Rojas, M., O. Gudenschwager, B. G. Defilippi, M. González-Agüero. 2012. Identification of genes possibly related to loss of quality in late-season “Hass” avocados in Chile. *Postharvest Biology and Technology* 73: 1-7.
- Garner, C. M., S. H. Kim, B. J. Spears, and W. Gassmann. 2016. Express yourself: transcriptional regulation of plant innate immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 56: 150-162.
- Gassmann, M., B. Grenacher, B. Rohde, J. Vogel. 2009. Quantifying western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30: 1845-1855.
- Geoffroy, P., M. Legrand, and B. Fritig. 1990. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to *Tobacco mosaic virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 327-333.
- Ghosh, R., and C. Chakrabarti. 2008. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta* 228: 883-890.
- Giguère, T., C. R. Adkar-Purushothama, F. Bolduc, and J. P. Perreault. 2014. Elucidation of the structures of all members of the *Avsunviroidae* family. *Molecular Plant Pathology* 15: 767-779.
- Glazebrook, J., E. E. Rogers, and F. M. Ausubel. 1996. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143: 973-982.
- Grenier, J., C. Potvin, J. Trudel, and A. Asselin. 1999. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1,3-glucans. *The Plant Journal* 19: 473-480.
- Griffith, M., and M. W. F. Yaish. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* 9: 399-405.

- Gudenschwager, O., M. García-Rojas, B. G. Defilippi, and M. González-Agüero. 2013. Identification and characterization of two putative genes encoding acetyl-coenzyme A carboxylase subunits that are possibly associated with internal browning during cold storage of “Hass” avocados (*Persea americana* Mill.). *Postharvest Biology and Technology* 84: 74–80.
- Gutterson, N., and T. L. Reuber. 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 465–471.
- Haas, A. (1952). Sun-blotch in avocado seedlings. *California Avocado Society Yearbook* 37: 167–171.
- Habib, H., and K. M. Fazili. 2007. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68–85.
- Haq, S. K., S. M. Atif, and R. H. Khan. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431: 145–159.
- Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321–334.
- Heitz, T., P. Geoffroy, B. Fritig, and M. Legrand. 1999. The PR-6 family: proteinase inhibitors in plant-microbe and plant-insect interactions. *In*: Datta S. K. and S. Muthukrishnan (eds.). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 138–162
- Hématy, K., C. Cherk, and S. Somerville. 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 406–413.
- Hernández, J. A., G. Gullner, M. J. Clemente-Moreno, A. Künstler, C. Juhász, P. Díaz-Vivancos, and L. Király. 2016. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94: 134–148.
- Hilker, M., J. Schwachtje, M. Baier, S. Balazadeh, I. Bäurle, S. Geiselhardt, D. K. Hinch, R. Kunze, B. Mueller-Roeber, M. C. Rillig, J. Rolff, T. Romeis, T. Schmölling, A. Steppuhn, J. van Dongen, S. J. Withcomb, S. Wurst, E. Zuther, and J. Kopka.

2016. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews* 91: 1118–1133.
- Hu, X. X., X. Z. Nie, Y. Song, X. Y. Xiong, and H. Tai. 2011. Ethylene is involved but plays a limited role in tomato *Chlorotic dwarf viroid*-induced symptom development in tomato. *Agricultural Sciences in China* 10: 544–552.
- Huang, S., O. Van Aken, M. Schwarzländer, K. Belt, and A. H. Millar. 2016. Roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signalling and stress response in plants. *Plant Physiology* 171: 1551–1559.
- Hutchins, C. J., P. Keese, J. E. Visvader, P. D. Rathjen, J. L. McInnes, and R. H. Symons. 1985. Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Molecular Biology* 4: 293–304.
- Jeandet, P., C. Clément, E. Courot, and S. Cordelier. 2013. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 14136–14170.
- Jones, J. D. G., and L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323–329.
- Ju, C., G. M. Yoon, J. M. Shemansky, D. Y. Lin, Z. I. Ying, J. Chang, W. M. Garret, M. Kessenbrock, G. Groth, M. L. Tucker, B. Cooper, and J. J. Kieber. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 19486–19491.
- Kachroo, A., and G. P. Robin. 2013. Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 527–533.
- Karlin, S., and S. F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 2264–2268.
- Katsarou, K., Y. Wu, R. Zhang, N. Bonar, J. Morris, P. E. Hedley, G. J. Bryan, K. Kalantidis, C. Hornyik. 2016. Insight on genes affecting tuber development in potato upon *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) infection. *PLoS ONE* 11: e0150711.

- Kendrick, M. D., and C. Chang. 2008. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 479–485.
- Kim, Y. S., Park, J. Y., Kim, K. S., Ko, M. K., Cheong, S. J., & Oh, B.-J. (2002). A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Molecular Biology* 49: 125–135.
- Kinkema, M., W. Fan, and X. Dong. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell* 12: 2339–2350.
- Kitajima, S., and F. Sato. 1999. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *Journal of Biochemistry* 125: 1–8.
- Koiwa, H., R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2: 379–384.
- Kovalskaya, N., and R. W. Hammond. 2014. Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science* 228: 48–60.
- Kroj, T., E. Chanclud, C. Michel-Romiti, X. Grand, and J. B. Morel. 2016. Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytologist* 210: 618–626.
- Kuo, T. M., G. Pearce, and C. A. Ryan. 1984. Isolation and characterization of proteinase inhibitor I from etiolated tobacco leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 230: 504–510.
- Kutsunai, S. Y., A. C. Lin, F. W. Percival, G. C. Laties, and R. E. Christoffersen. 1993. Ripening-related polygalacturonase cDNA from avocado. *Plant Physiology* 103: 289–290.
- Lawton, K. A., L. Friedrich, M. Hunt, K. Weymann, T. Delaney, H. Kessmann, T. Staub, and J. Ryals. 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal* 10: 71–82.

- Lawton, K. A., S. L. Potter, S. Uknes, and J. Ryals. 1994. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell* 6: 581-588.
- Lebel, E., P. Heifetz, L. Thorne, S. Uknes, J. Ryals, and E. Ward. 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 16: 223-233.
- Lee, H. J., Y. J. Park, P. J. Seo, J. H. Kim, H. J. Sim, S. G. Kim, and C. M. Park. 2015. Systemic immunity requires SnRK2.8-mediated nuclear import of NPR1 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27: 3425-3438.
- Lee, J. S., W. E. Brown, J. S. Graham, G. Pearce, E. A. Fox, T. W. Dreher, K. G. Ahern, G. D. Pearson, and C. A. Ryan. 1986. Molecular characterization and phylogenetic studies of a wound-inducible proteinase inhibitor I gene in *Lycopersicon* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 7277-7281.
- Leon-Reyes, A., S. H. Spoel, E. S. De Lange, H. Abe, M. Kobayashi, S. Tsuda, F. F. Millenaar, R. A. M. Welschen, T. Ritsema, and C. M. J. Pieterse. 2009. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology* 149: 1797-1809.
- Li, Q., M. Zhang, D. Shen, T. Liu, Y. Chen, J. M. Zhou, and D. Dou. 2016. A *Phytophthora sojae* effector PsCRN63 forms homo-/hetero-dimers to suppress plant immunity via an inverted association manner. *Scientific Reports* 6: 26951.
- Li, X., Y. Zhang, J. D. Clarke, Y. Li, and X. Dong. 1999. Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* 98: 329-339.
- Lin, B., K. Zhuo, S. Chen, L. Hu, L. Sun, X. Wang, L. H. Zhang, and J. Liao. 2016. A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species-scavenging system. *New Phytologist* 209: 1159-1173.
- Liu, J. J., R. Sturrock, and A. K. M. Ekramoddoullah. 2010. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* 29: 419-436.

- Luttig, M., and B. Q. Manicom. 1999. Application of a highly sensitive *Avocado sunblotch viroid* indexing method. South African Avocado Growers' Association Yearbook 22: 55–60.
- Macho, A. P., and C. Zipfel. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* 54: 263–272.
- Macías, A. 2011. México en el mercado internacional de aguacate. *Revista de Ciencias Sociales* 17: 517–532.
- Madi, L., X. Wang, I. Kobiler, A. Lichter, and D. Prusky. 2003. Stress on avocado fruits regulates delta 9-stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 277–283.
- Mahomed, W., and N. van den Berg. 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biology* 11: 167.
- Malfitano, M., F. Di Serio, L. Covelli, A. Ragozzino, C. Hernández, and R. Flores. 2003. Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* 313: 492–501.
- Malnoy, M., Q. Jin, E. E. Borejsza-Wysocka, E. E., S. Y. He, H. S. Aldwinckle. 2007. Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus × domestica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1568–1580.
- Martin, G. B., A. J. Bogdanove, and G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23–61.
- Margossian, L. J., A. D. Federman, J. J. Giovannoni, and R. L. Fischer. 1988. Ethylene-regulated expression of a tomato fruit ripening gene encoding a proteinase inhibitor I with a glutamic residue at the reactive site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 8012–8016.
- Mase, K., T. Mizuno, N. Ishihama, T. Fujii, H. Mori, M. Kodama, and H. Yoshioka. 2012. Ethylene signaling pathway and MAPK cascades are required for AAL toxin-

- induced programmed cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1015–1025.
- Matoušek, J., R. J. J. Piernikarczyk, A. Týcová, G. S. Duraisamy, T. Kocábek, and G. Steger. 2015. Expression of SANT/HTH Myb mRNA, a plant morphogenesis-regulating transcription factor, changes due to viroid infection. *Journal of Plant Physiology* 183: 85–94.
- McGarvey, D. J., R. Sirevåg, and R. E. Christoffersen. 1992. Ripening-related gene from avocado fruit ethylene-inducible expression of the mRNA and polypeptide. *Plant Physiology* 98: 554–559.
- McPhalen, C. A., I. Svendsen, I. Jonassen, M. N. James. 1985. Crystal and molecular structure of chymotrypsin inhibitor 2 from barley seeds in complex with subtilisin Novo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 7242–7246.
- Meng, X., and S. Zhang. 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Plant Biology* 51: 245–266.
- Meur, G., M. Budatha, T. Srinivasan, K. R. R. Kumar, A. D. Gupta, and P. B. Kirti. 2008. Constitutive expression of *Arabidopsis* NPR1 confers enhanced resistance to the early instars of *Spodoptera litura* in transgenic tobacco. *Physiologia Plantarum* 133: 765–775.
- Min, K., S. C. Ha, P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, D. J. Yun, K. K. Kim. 2004. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 54: 170–173.
- Misra, R. C., M. Kamthan, S. Kumar, and S. Ghosh. 2016. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 6: 25340.
- Mittler, R., O. Del Pozo, L. Meisel, and E. Lam. 1997. Pathogen-induced programmed cell death in plants, a possible defense mechanism. *Developmental Genetics* 21: 279–289.

- Mou, Z., W. Fan, and X. Dong. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935–944.
- Mount, S. M., and C. Chang. 2002. Evidence for a plastid origin of plant ethylene receptor genes. *Plant Physiology* 130: 10–14.
- Mukhtar, M. S., M. T. Nishimura, and J. Dangl. 2009. NPR1 in plant defense: it's not over "til it"s turned over. *Cell* 137: 804–806.
- Nakano, T., K. Suzuki, T. Fujimura, and H. Shinshi. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140: 411–432.
- Narasimhan, M. L., B. Damsz, M. A. Coca, J. I. Ibeas, D. J. Yun, J. M. Pardo, P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. 2001. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Molecular Cell* 8: 921–930.
- Navarro, B., A. Gisel, M. E. Rodio, S. Delgado, R. Flores, and F. Di Serio. 2012. Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94: 1474–1480.
- Nühse, T. S. 2012. Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 3: 280.
- Ohme-Takagi, M., and H. Shinshi. 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7: 173–182.
- Ohme-Takagi, M., K. Suzuki, and H. Shinshi. 2000. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant and Cell Physiology* 41: 1187–1192.
- Ohta, M., M. Ohme-Takagi, and H. Shinshi. 2000. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *The Plant Journal* 22: 29–38.
- Ortega, M. 2003. Valor nutrimental de la pulpa fresca de aguacate Hass. *In: Proceedings V World Avocado Congress*. Spain. pp. 741–748.
- Osmond, R. I. W., M. Hrmova, F. Fontaine, A. Imberty, and G. B. Fincher. 2001. Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)- β -D-glucans: kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. *European Journal of Biochemistry* 268: 4190–4199.

- Owens, R. A., K. B. Tech, J. Y. Shao, T. Sano, and C. J. Baker. 2012. Global analysis of tomato gene expression during *Potato spindle tuber viroid* infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 582–598.
- Owino, W. O., R. Nakano, Y. Kubo, and A. Inaba. 2002. Differential regulation of genes encoding ethylene biosynthesis enzymes and ethylene response sensor ortholog during ripening and in response to wounding in avocados. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 520–527.
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., D. K. Emerine, and M. S. Mukhtar. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in Plant Science* 18: 402–411.
- Pallás, V., I. García-Luque, E. Domingo, and R. Flores. 1988. Sequence variability in *Avocado sunblotch viroid* (ASBV). *Nucleic Acids Research* 16: 9864.
- Palukaitis, P., T. Hatta, and D. M. Alexander. 1979. Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99: 145-151.
- Pant, S. R., B. T. McNeece, K. Sharma, P. Niruala, H. E. Burson, G. W. Lawrence, V. P. Klink. 2016. The heterologous expression of a *Glycine max* homolog of NONEXPRESSOR OF PR1 (NPR1) and α -hydroxynitrile glucosidase suppresses parasitism by the root pathogen *Meloidogyne incognita* in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Plant Interactions* 11: 41–52.
- Parkhi, V., V. Kumar, G. Sunilkumar, L. M. Campbell, N. K. Singh, and K. S. Rathore, K. S. 2009. Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Molecular Breeding* 23: 625–639.
- Pautot, V., F. M. Holzer, and L. L. Walling. 1991. Differential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 284–292.
- Peng, J. H., and L. L. Black. 1976. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 66: 958–963.

- Phukan, U. J., G. S. Jeena, V. Tripathi, R. K. Shukla. 2017. Regulation of Apetala2/Ethylene response factors in plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 150.
- Pieterse, C. M., S. C. van Wees, J. A. van Pelt, M. Knoester, R. Laan, H. Gerrits, P. J. Weisbeek, and L. C. van Loon. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1571–1580.
- Pieterse, C., and L. C. van Loon. 2004. NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 456–464.
- Rakowski, A., and R. Symons. 1989. Comparative sequence studies of variants of *Avocado sunblotch viroid*. *Virology* 173: 352–356.
- Rawlings, N. D., D. P. Tolle, and A. J. Barrett. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal* 378: 705–716.
- Reeksting, B. J., N. Coetzer, W. Mahomed, J. Engelbrecht, and N. Van Den Berg. 2014. De novo sequencing, assembly, and analysis of the root transcriptome of *Persea americana* (Mill.) in response to *Phytophthora cinnamomi* and flooding. *PLoS ONE* 9: e86399.
- Regalado, A. P., and C. P. P. Ricardo. 1996. Study of the intercellular fluid of healthy *Lupinus albus* organs (presence of a chitinase and a thaumatin-like protein). *Plant Physiology* 110: 227–232.
- Roberts, W. K., and C. P. Selitrennikoff. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* 136: 1771–1778.
- Rochon, A., P. Boyle, T. Wignes, P. R. Fobert, and C. Després. 2006. The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell* 18: 3670–3685.
- Rodrigo, I., P. Vera, P. Tornero, J. Hernández-Yago, and V. Conejero. 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23, characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiology* 102: 939–945.
- Rodrigo, I., P. Vera, R. Frank, and V. Conejero. 1991. Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato

protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Molecular Biology* 16: 931–934.

Ryals, J., K. Weymann, K. Lawton, L. Friedrich, D. Ellis, H. Y. Steiner, J. Johnson, T. P. Delaney, T. Jesse, P. Vos, and S. Uknes. 1997. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *The Plant Cell* 9: 425–439.

Ryan, C. A. 1992. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Molecular Biology* 19: 123–133.

Ryan, C. A., and A. K. Balls. 1962. An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 48: 1839–1844.

Salazar-García, S., J. Velasco-Cárdenas, R. Medina-Torres, y J. R. Gómez-Aguilar. 2004. Selecciones de aguacate con potencial de uso como portainjertos. I. Prendimiento y crecimiento de injertos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 23–30.

Saleh, A., J. Withers, R. Mohan, J. Marqués, Y. Gu, S. Yan, R. Zavaliev, M. Nomoto, Y. Tada, and X. Dong. 2015. Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host and Microbe* 18: 169–182.

Sánchez-Pérez, J. L. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 7–18.

Sarris, P. F., V. Cevik, G. Dagdas, J. D. G. Jones, and K. V. Krasileva. 2016. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biology* 14: 8.

Saucedo-Carabez, J. R., D. Téliz-Ortiz, S. Ochoa-Ascencio, D. Ochoa-Martínez, M. R. Vallejo-Pérez, and H. Beltrán-Peña. 2014. Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on avocado yield in Michoacan, Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 138: 799–805.

- Schimoler-O'Rourke, R., M. Richardson, and C. P. Selitrennikoff. 2001. Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2365–2366.
- Schnell, R. J., C. L. Tondo, D. N. Kuhn, M. C. Winterstein, T. Ayala-Silva, and J. M. Moore. 2011. Spatial analysis of avocado sunblotch disease in an avocado germplasm collection. *Journal of Phytopathology* 159: 773–781.
- Schnell, R., D. N. Kuhn, C. Olano, and W. Quintanilla. 2001. Sequence diversity among avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica* 29: 451–460.
- Schnell, R. J., D. N. Kuhn, C. M. Ronning, and D. Harkins. 1997. Application of RT-PCR for indexing *Avocado sunblotch viroid*. *Plant Disease* 81: 1023–1026.
- Schreiber, K. J., M. Baudin, J. A. Hassan, and J. D. Lewis. 2016. Die another day: molecular mechanisms of effector-triggered immunity elicited by type III secreted effector proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 56: 124–133.
- Sels, J., J. Mathys, B. M. A. De Coninck, B. P. A. Cammue, and M. F. C. De Bolle. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941–950.
- Semancik, J. S., and J. A. Szychowski. 1994. Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75: 1543–1549.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp. (Noviembre 1, 2016)
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2016). Atlas agroalimentario 2016. México: SAGARPA/Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Shah, J., F. Tsui, and D. F. Klessig. 1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the

- SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 69–78.
- Shah, J., P. Kachroo, and D. F. Klessig. 1999. The *Arabidopsis* *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *The Plant Cell* 11: 191–206.
- Shetty, N. P., J. D. Jensen, A. Knudsen, C. Finnie, N. Geshi, A. Blennow, D. B. Collinge, and H. J. L. Jørgensen. 2009. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60: 4287–4300.
- Silva, K. J., A. Brunings, N. A. Peres, Z. Mou, and K. M. Folta. 2015. The *Arabidopsis* NPR1 gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry. *Transgenic Research* 24: 693–704.
- Sinha, M., R. P. Singh, G. S. Kushwaha, N. Iqbal, A. Singh, S. Kaushik, P. Kaur, S. Sharma, and T. P. Singh. 2014. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* 2014: 543195.
- Skadsen, R. W., P. Sathish, and H. F. Kaeppler. 2000. Expression of thaumatin-like permatin PR-5 genes switches from the ovary wall to the aleurone in developing barley and oat sedes. *Plant Science* 156: 11–22.
- Solano, R., A. Stepanova, Q. Chao, and J. R. Ecker. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* 12: 3703–3714.
- Somssich, I. E. 2003. Closing another gap in the plant SAR puzzle. *Cell*. 113: 815–816.
- Sperschneider, J., D. M. Gardiner, P. N. Dodds, F. Tini, L. Covarelli, K. B. Singh, J. M. Manners, and J. M. Taylor. 2016. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist* 210: 743–761.
- Spoel, S. H., and X. Dong. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12: 89–100.
- Spoel, S. H., A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Pelt, M. J. Van, Mueller, A. J. Buchala, J. P. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. van Loon, X.

- Dong, and C. M. J. Pieterse. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* 15: 760–770.
- Spoel, S. H., Z. Mou, Y. Tada, N. W. Spivey, P. Genschik, and X. Dong. 2009. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* 137: 860–872.
- Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemann-Merdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand, and B. Fritig. 1993. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687–706.
- Sultan, S. E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* 5: 537–542.
- Symons, R. 1981. *Avocado sunblotch viroid*: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Research* 9: 6527–6537.
- Tada, Y., S. H. Spoel, K. Pajerowska-Mukhtar, Z. Mou, J. Song, C. Wang, J. Zuo, and X. Dong. 2008. Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952–956.
- Taiz, L., & E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology* (3rd ed.). Sinauer Associates, Sunderland, MA. USA.
- Tamayo, M. C., M. Rufat, J. M. Bravo, and B. San Segundo. 2000. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211: 62–71.
- Tan, H. Y., and T. W. Ng. 2008. Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. *Optics Communications* 281: 3013–3017.
- Tateishi, A., H. Shiba, J. Ogihara, K. Isobe, K. Nomura, K. Watanabe, and H. Inoue. 2007. Differential expression and ethylene regulation of β -galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 45: 56–65.

- Tonutti, P., L. G. Cass, and R. E. Christoffersen. 1995. The expression of cellulase gene family members during induced avocado fruit abscission and ripening. *Plant, Cell and Environment* 18: 709–713.
- Toruño, T. Y., I. Stergiopoulos, G. Coaker. 2016. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*. 54: 419–441.
- Trudel, J., J. Grenier, C. Potvin, and A. Asselin. 1998. Several thaumatin-like proteins bind to β -1,3-glucans. *Plant Physiology* 118: 1431–1438.
- Turra, D., D. Bellin, M. Lorito, and C. Gebhardt. 2009. Genotype-dependent expression of specific members of potato protease inhibitor gene families in different tissues and in response to wounding and nematode infection. *Journal of Plant Physiology* 166: 762–774.
- Turra, D., and M. Lorito. 2011. Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. *Current Protein and Peptide Science* 12: 374–385.
- Tuzun, S., and A. Somanchi. 2006. The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic. *In: Tuzun S., and E. Bent (eds.), Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer, New York, US. pp. 112–142
- Underwood, W. 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* 3: 85.
- Underwood, W. 2016. Contributions of host cellular trafficking and organization to the outcomes of plant-pathogen interactions. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 56: 163–173.
- Vallejo-Pérez, M. R., D. Téliz-Ortiz, M. T. Colinas-León, R. De la Torre-Almaraz, G. Vladovinos-Ponce, D. Nieto-Ángel, and D. L. Ochoa-Martínez. 2015. Alterations induced by Avocado sunblotch viroid in the postharvest physiology and quality of avocado ‘Hass’ fruit. *Phytoparasitica* 43: 355–364.

- Valueva, T. A., and V. V. Mosolov. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 69: 1305–1309.
- Vanacker, H., H. Lu, D. Rate, and J. Greenberg. 2001. A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28: 209–216.
- Van Damme, E. J. M., D. Charels, L. Menu-Bouaouiche, P. Proost, A. Barre, P. Rougé, W. J. Peumans. 2002. Biochemical, molecular and structural analysis of multiple thaumatin-like proteins from the elderberry tree (*Sambucus nigra* L.). *Planta* 214: 853–862.
- Van Den Broek, L. A. M., L. Pouvreau, G. Lommerse, B. Schipper, G. A. Van Koningsveld, H. Gruppen. 2004. Structural characterization of potato protease inhibitor I (cv. Bintje) after expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4928–4934.
- van Loon, L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*. 4: 111–116.
- van Loon, L. C. 1990. The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Pathology* 37: 229–230.
- van Loon, L. C. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. *In: Datta S. K., and S. Muthukrishnan (eds.). Pathogenesis-Related Proteins in Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 12-30.
- van Loon, L. C., and A. van Kammen. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN." *Virology* 40: 199–211.
- van Loon, L. C., and E. A. van Strien. 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.
- van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135–162.

- van Loon, L. C., W. S. Pierpoint, T. Boller, and V. Conejero. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245–264.
- Velazhahan, R., S. K. Datta, and S. Muthukrishnan. 1999. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. *In: Datta, S. K., and S. Muthukrishnan (eds.), Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 107-129
- Vernooij, B., L. Friedrich, P. Ahl-Goy, T. Staub, and H. Kessmann. 1995. 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 228–234.
- Vo, K., C. Kim, A. Chandran, K. Jung, and J. Jeon. 2015. Molecular insights into the function of ankyrin proteins in plants. *Journal of Plant Biology* 58: 271–284.
- Wallace, J. M. 1967. Infected symptomless avocado trees and their possible use in avoiding sunblotch disease. *California Avocado Society Yearbook* 51: 187-189
- Wang, H. Y., Y. C. Huang, S. F. Chen, and K. W. Yeh. 2003. Molecular cloning, characterization and gene expression of a water deficiency and chilling induced proteinase inhibitor I gene family from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) leaves. *Plant Science* 165: 191–203.
- Wang, J., Z. Y. Shi, X. S. Wan, G. Z. Shen, and J. L. Zhang. 2008. The expression pattern of a rice proteinase inhibitor gene OsPI8-1 implies its role in plant development. *Journal of Plant Physiology* 165: 1519–1529.
- Wang, W., T. R. Bostic, L. Gu. 2010. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry* 122: 1193–1198.
- Wang, X., D. Beno-Moualem, I. Kobiler, A. Leikin-Frenkel, A. Lichter, and D. Prusky. 2004. Expression of Δ 12 fatty acid desaturase during the induced accumulation of the antifungal diene in avocado fruits. *Molecular Plant Pathology* 5: 575–585.
- Wang, X., I. Kobiler, A. Lichter, A. Leikin-Frenkel, D. Prusky, D. 2004. Enhanced expression of *avfae1* encoding a long-chain fatty acid elongase during the induction of the antifungal diene in avocado fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 171–180.

- Weeda, S. M., G. N. M. Kumar, G. N. M., and N. R. Knowles. 2009. Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. *Planta* 230: 73–84.
- Wiesner-Hanks, T., and R. Nelson. 2016. Multiple disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 54: 229–252.
- Wingate, V. P. M., V. R. Franceschi, and C. A. Ryan. 1991. Tissue and cellular localization of proteinase inhibitors I and II in the fruit of the wild tomato, *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. *Plant Physiology* 97: 490–495.
- Withers, J., and X. Dong. 2016. Posttranslational modifications of NPR1: a single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS Pathogens* 12: e1005707.
- Wu, L., H. Chen, C. Curtis, and Z. Q. Fu. 2014. Go in for the kill: how plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* 5: 710–721.
- Wu, S., L. Shan, and P. He. 2014. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science* 228: 118–126.
- Wu, Y., D. Zhang, J. Y. Chu, P. Boyle, Y. Wang, I. D. Brindle, V. De Luca, and C. Després. 2012. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports* 1: 639–647.
- Xing, T. I. M., and M. Jordan. 2000. Genetic engineering of plant signal transduction mechanisms. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 309–318.
- Yu, D., C. Chen, Z. Chen. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *The Plant Cell* 13: 1527–1539.
- Zhang, X., M. I. Francis, W. O. Dawson, J. H. Graham, V. Orbović, E. W. Triplett, E. W., and Z. Mou. 2010. Over-expression of the *Arabidopsis* NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *European Journal of Plant Pathology* 128: 91–100.

- Zhang, Y., G. A. Barthe, J. Grosser, N. Wang. 2016. Transcriptome analysis of root response to citrus blight based on the newly assembled Swingle citrumelo draft genome. *BMC Genomics* 17: 485.
- Zhang, Y., W. Fan, M. Kinkema, X. Li, and X. Dong. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 6523–6528.
- Zhou, J. M., Y. Trifa, H. Silva, D. Pontier, E. Lam, J. Shah, and D. F. Klessig. 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 191–202.
- Zhu, Y., S. Shin, and M. Mazzola. 2016. Genotype responses of two apple rootstocks to infection by *Pythium ultimum* causing apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38: 483–491.
- Ziv, D., T. Zviran, O. Zezak, A. Samach, and V. Irihimovitch. 2014. Expression profiling of FLOWERING LOCUS T-like gene in alternate bearing “Hass” avocado trees suggests a role for PaFT in avocado flower induction. *PLoS ONE* 9: 10.