

Differential gene expression of avocado defense genes in response to avocado sunblotch viroid infection

Expresión diferencial de genes de defensa en aguacate en respuesta a la infección del viroide de la mancha de sol del aguacate

Luis Alberto López-Rivera, Iván Ramírez-Ramírez, Víctor Arturo González-Hernández, Nicacio Cruz-Huerta*, Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; Daniel Téliz-Ortiz, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. *Autor para correspondencia: nacruz@colpos.mx.

Recibido: 29 de Julio, 2017.

Aceptado: 09 de Octubre, 2017.

López-Rivera LA, Ramírez-Ramírez I, González-Hernández VA, Cruz-Huerta N, Téliz-Ortiz D. 2017. Differential gene expression of avocado defense genes in response to avocado sunblotch viroid infection. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 151-161.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-5

Primera publicación DOI: 22 de Noviembre, 2017.

First DOI publication: November 22, 2017.

Resumen. En aguacate se ha demostrado la participación de proteínas relacionadas con patogénesis en la defensa contra algunos de sus patógenos más importantes. Sin embargo, en la enfermedad de la mancha de sol del aguacate causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) aún quedan algunos componentes de la respuesta de defensa por aclarar. En particular, la infección por ASBVd puede ser asintomática o causar síntomas, lo cual genera incógnitas sobre el mecanismo de defensa de la planta. En esta investigación se analiza la expresión de genes codificantes de proteínas de defensa,

Abstract. Involvement of pathogenesis related proteins in defense against some of the most important avocado pathogens has been shown. However, infections caused by *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) require further research to elucidate the response components. Avocado response to ASBVd infections can be either asymptomatic or symptomatic, which further raises questions about plant defense mechanisms. This research analyzed the expression of genes *PanPRI*, *EREBP*, *PR-5* and *PR-6*, which encode defense proteins, in symptomatic and asymptomatic avocado leaves and fruits infected with ASBVd. Data analysis shows that ASBVd infections modify the expression of *PR-5* and *PR-6*, while the expression of *PanPRI* and *EREBP* does not change. Expression differences on fruit were more evident with *PR-5* on fruit from asymptomatic trees; *PR-6* had higher expression on infected fruits but there were no differences between symptomatic and asymptomatic fruits. The coordinated expression of both genes on fruit suggest the activation of a synergistic defense mechanism in response to ASBVd infection.

PaNPR1, *EREBP*, *PR-5* y *PR-6* en hojas y frutos de aguacate infectado por ASBVd, en condición sintomática y asintomática. El análisis de datos muestra que la infección de ASBVd modifica la expresión de los genes *PR-5* y *PR-6*, mientras que la de *PaNPR1* y *EREBP* no se modifica. Se encontraron diferencias en la expresión en frutos, siendo notable con *PR-5* en frutos de árboles asintomáticos; a su vez, *PR-6* se expresa más en 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*.

La enfermedad de la mancha de sol causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es una de las infecciones más persistentes en el aguacate producido en México (Vallejo-Pérez *et al.*, 2017). Esta enfermedad causa efectos citopáticos y cambios fisiológicos (Di Serio *et al.*, 2013; Saucedo-Carabez *et al.*, 2014; Vallejo-Pérez *et al.*, 2014; Saucedo-Carabez *et al.*, 2015; Vallejo-Pérez *et al.*, 2015), que finalmente resultan en frutos de menor tamaño y calidad externa e interna, y con menor rendimiento de fruto. En los frutos, los daños severos incluyen heridas deprimidas en su superficie que varían desde un color amarillo hasta manchas necróticas (Desjardins, 1987). A pesar de su severidad, el ASBVd tiene la particularidad de causar infecciones asintomáticas en los árboles (Semancik y Szychowski, 1994), y con ello un mayor riesgo de diseminación no intencionada, por material vegetal o por semilla. La primera estrategia de control de la enfermedad es la identificación de árboles infectados y esta se puede complementar con la

Key words: *Avocado sunblotch viroid*, *Persea americana*, *PR* genes.

Avocado sunblotch is a disease caused by *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), one of the most persistent infections that affects avocado production in Mexico (Vallejo-Pérez *et al.*, 2017). Avocado sunblotch causes cytopathic effects and physiological changes (Di Serio *et al.*, 2013; Saucedo-Carabez *et al.*, 2014; Vallejo-Pérez *et al.*, 2014; Saucedo-Carabez *et al.*, 2015; Vallejo-Pérez *et al.*, 2015) that result in smaller fruit, low external and internal quality and reduced yield. Severe damages on fruit include depressed wounds on the surface with yellow to necrotic spots (Desjardins, 1987). In spite of its severity, a particular feature of ASBVd is that it causes asymptomatic infections in trees (Semancik and Szychowski, 1994), a fact that poses a high risk of non-intentional dispersion by plant material or seed. The first strategy to control this disease is the identification of infected trees, followed by identification of the defense mechanisms that allow a tree to show no symptoms.

Genes regulated during the defense response to pathogens in avocado have been found in gene expression profiles and have shown the molecular basis of the plant-pathogen interaction. These studies have mainly focused on infections by *Colletotrichum gloeosporioides* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2012) and *Phytophthora cinnamomi* (Mahomed and Van Den Berg, 2011). *PR* genes in avocado are particularly important because they favor an induced immune mechanism known as systemic acquired resistance. This study initiated with the hypothesis that the gene expression cascade in the avocado defense response to ASBVd (responsible for avocado sunblotch infection) is different between asymptomatic and symptomatic trees, possibly due to differential defensive capacity

identificación de los mecanismos de defensa que le permiten a un árbol no manifestar los síntomas de la enfermedad.

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. 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, es diferente en árboles asintomáticos de aquellos que presentan síntomas, posiblemente indicando una capacidad de defenderse del ataque de esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue describir los cambios en niveles de expresión de los genes de defensa seleccionados en plantas infectadas con síntomas y asintomáticas de la infección de ASBVd.

Se colectaron hojas maduras y frutos inmaduros de nueve árboles de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass de un huerto comercial (19°26'6"N 101°52'28"O, 1610 m de elevación). Los árboles fueron previamente identificados como árboles sanos, árboles positivos a ASBVd con síntomas visibles y árboles positivos asintomáticos (Vallejo-Pérez *et al.*, 2015) y sin síntomas de otra enfermedad. Se muestrearon tres hojas y tres frutos por árbol en tres árboles de cada grupo.

Se eligieron cuatro genes relacionados con defensa a patógenos en aguacate: *PaNPRI* (Backer *et al.*, 2015), *PR-5*, *PR-6* y *EREBP* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013). El gen de actina (Reeksting *et al.*, 2014) se usó como gen de referencia. Las secuencias de los

against the disease. Thus, this study described changes in the level of expression of defense genes selected in symptomatic and asymptomatic ASBVd-infected plants.

Mature leaves and unripe fruit from nine avocado trees (*Persea americana* Mill.) cv. Hass were collected in a commercial orchard (19°26'6" N 101°52'28" O, 1610 m altitude). Trees were previously classified as healthy, positive for ASBVd with visible symptoms, and positive for ASBVd without symptoms (Vallejo-Pérez *et al.*, 2015), and with no visible symptoms from another disease. Three leaves and three fruits from three trees of each group were sampled.

Four genes associated with pathogen defense in avocado were selected: *PaNPRI* (Backer *et al.*, 2015), *PR-5*, *PR-6* and *EREBP* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013). The actin gene (Reeksting *et al.*, 2014) was used as a reference gene. Sequences of the primers were taken from the mentioned references. ASBVd detection required primers designed by Schnell *et al.* (1997).

Total RNA extraction involved tandem use of PureLink® Plant RNA Reagent (Invitrogen) and Direct-zol® RNA MiniPrep (Zymo Research) as per manufacturer's directions to deal with high phenol and polysaccharides content in sample tissue. RNA concentration and quality were measured in a Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, USA), and the integrity of each sample was verified on a denaturing gel, according to the protocol by Aranda *et al.* (2012).

A mixture (10 µL final volume per reaction) containing the following substances was prepared to perform reverse transcription and amplification: 1X of Reaction Mix buffer (0.2 mM of each dNTP and 1.6 mM of MgSO₄), 0.2 µM of sense primer, 0.2 mM of antisense primer, 0.4 µL of Super Script® III RT/Platinum® TaqMix (Invitrogen), and 100 ng of total RNA; the volume was completed by

iniciadores se tomaron de las referencias mencionadas. Para la detección del ASBVd se emplearon los iniciadores diseñados por Schnell *et al.* (1997).

Para la extracción de RNA total, se usaron en forma conjunta los métodos PureLink[®] Plant RNA Reagent (Invitrogen) y Direct-zol[®] RNA MiniPrep (Zymo Research), de acuerdo con los manuales de cada kit, debido al alto contenido de fenoles y polisacáridos en el tejido. La concentración y calidad del RNA se midieron en un Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, EUA), y la integridad de cada muestra se verificó en gel desnaturalizante de acuerdo con el protocolo de Aranda *et al.* (2012).

Para la retrotranscripción y amplificación, en un volumen final de 10 µL por reacción se mezclaron: 1X de Reaction Mix buffer (0.2 mM de cada dNTP y 1.6 mM de MgSO₄), 0.2 µM de iniciador sentido, 0.2 mM de iniciador antisentido, 0.4 µL de SuperScript[®] III RT/Platinum[®] TaqMix (Invitrogen), 100 ng de RNA total, y se completó el volumen con agua tratada con DEPC. Las reacciones se corrieron en un termociclador (Applied Biosystems 2720, EUA) con las siguientes condiciones: síntesis de cDNA 1 ciclo de 32 min a 50 °C; 1 ciclo de 2 min a 94 °C; seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s con la temperatura de alineamiento calculada (TA) para cada iniciador (Cuadro 1), 15 s a 68 °C. Por último, se programó 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. Los geles fueron expuestos a luz UV en el fotodocumentador (Vilber Lourmat Infinity-1000/26MX, Francia) para obtener imágenes de los productos finales. La prueba de detección del patógeno se ejecutó con RT-PCR dúplex en un solo paso empleando los iniciadores del ASBVd y de actina. 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

adding DEPC-treated water. PCR reactions were conducted in a thermocycler (Applied Biosystems 2720, EUA) under the following conditions: cDNA synthesis 1 cycle of 32 min at 50 °C; 1 cycle of 2 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C, 15 s using the calculated annealing temperature (TA) for each primer (Table 1), and 15 s at 68 °C. Finally, a 5 min elongation step at 68 °C was added. RT-PCR products were separated by electrophoresis in 2%/TAE agarose gel at 80 V for 60 min. Gels were exposed to UV light in a UV-transilluminator (Vilber Lourmat Infinity-1000/26MX, France) to capture images of the final products. Pathogen detection tests were carried out using single-step duplex RT-PCR, ASBVd and actin primers. The mixture used for a 10 µL final volume of reaction contained 1X Reaction Mix buffer, 0.2 µM of both primers (sense and antisense), 0.4 µL of SuperScript[®] III RT/Platinum[®] TaqMix, and 100 ng of total RNA; the volume was completed by adding DEPC-treated water. Amplification conditions were similar to those described previously. Defense genes and ASBVd viroid were detected in three samples of mature leaves and three samples of

Cuadro 1. Temperaturas de alineamiento calculadas (TA) para ejecutar la RT-PCR de un solo paso y tamaño de los productos esperados en pares de bases (pb).

Table 1. Calculated annealing temperature (TA) for one-step RT-PCR, and size of the expected products in base pairs (pb).

Iniciador	TA (°C)	Tamaño del producto (pb)
ASBVd	52.0*	250
<i>Actina</i>	57.1	103
<i>PaNPR1</i>	56.3	119
<i>PR-5</i>	55.6	171
<i>PR-6</i>	52.0	158
<i>EREBP</i>	61.6	96

*Temperatura de alineamiento para la prueba de detección del ASBVd por RT-PCR dúplex / *Annealing temperature to detect ASBVd through duplex RT-PCR.

RT/Platinum® TaqMix; 100 ng de RNA total, y se completó el volumen con agua tratada con DEPC. Las condiciones en el termociclador son iguales a las ya mencionadas. En los análisis de los genes de defensa y detección de ASBVd, se analizaron tres muestras de hoja madura y tres muestras de fruto inmaduro por grupo de árboles sanos, con síntomas y asintomáticos. Nueve bandas del viroide obtenidas de tejido de hoja, cuatro de árboles con síntomas y cinco de árboles asintomáticos, fueron secuenciadas (Macrogen Inc, Seoul, Corea) y comparadas con BLASTn del NCBI.

Con el programa de análisis de imágenes ImageJ® se comparó la densidad de bandas en gel de agarosa (Schneider *et al.*, 2012). 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. Las gráficas resultantes indican un perfil de intensidad relativa media, tomada de una región de interés constante. Las diferencias entre los tejidos y los árboles se analizaron por la prueba t de Student. La significancia estadística se consideró con $p \leq 0.05$.

La prueba de detección del ASBVd indica que el tejido de árboles infectados amplificó una banda de aproximadamente 250 pb, que coincide con el tamaño esperado del patógeno en cuestión, banda que no se presenta en árboles sanos (Figura 1). La amplificación del gen de actina indica que la reacción se llevó a cabo en todas las muestras analizadas. Las secuencias analizadas mostraron alta coincidencia con tres aislamientos del ASBVd (KF562705.1, KF562706.1 y KF562704.1, Identidad >92%; valor $E < 7 \times 10^{-67}$, datos no mostrados) reportados en las zonas productoras de aguacate (Beltrán *et al.*, 2014).

Los productos de la amplificación separados por electroforesis se presentan en la Figura 2. Los tejidos de árboles sanos muestran expresión basal de los genes evaluados, por lo que las comparaciones

unripe fruit per group from healthy, symptomatic and asymptomatic trees. Nine viroid bands from leaf tissue, four from symptomatic trees and five from asymptomatic trees were sequenced (Macrogen Inc, Seoul, Corea) and compared using BLASTn from the NCBI.

Band density was compared using image processing with ImageJ® (Schneider *et al.*, 2012). Band density values were normalized by data transformation $\sqrt{(x+1)}$, compared with the actin density values and then plotted. The resulting graphs display a profile of the average relative intensity taken from a constant region of interest. Differences between tissue and trees were analyzed using Student's t-test. Statistical significance was considered as $p \leq 0.05$.

The detection test for ASBVd on tissue from infected trees amplified a band of approximately 250 pb, which coincides with the expected size of the studied pathogen; this band is not present in healthy trees (Figure 1). Amplification of the actin gene shows that a reaction occurred in all the analyzed samples. Sequencing of the bands highly matched three ASBVd isolates (KF562705.1, KF562706.1 and KF562704.1, greater than 92% identity, and E-value less than 7×10^{-67} , data not shown) found in avocado production areas (Beltrán *et al.*, 2014).

Amplified products separated by electrophoresis are shown in Figure 2. Healthy tree samples show basal expression of the tested genes and serve as expression reference to ASBVd infection between infected trees (symptomatic and asymptomatic) and healthy trees. Surface and percentage data calculated by ImageJ® were used to calculate relative density of each band; this relative density was adjusted to the level of expression of the actin gene reference (Figure 3).

The *PaNPR1* and *EREBP* genes did not show significant differences in differential expressions

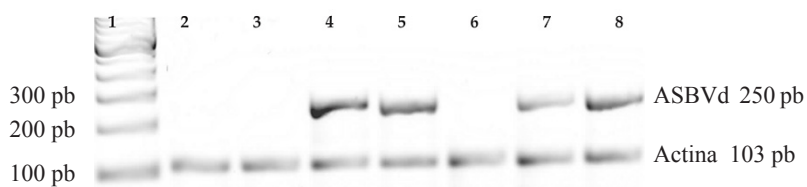


Figura 1. Detección del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en aguacate. Productos amplificados por RT-PCR dúplex de un solo paso. Los tejidos positivos para la infección con ASBVd muestran dos productos, el que pertenece al viroide de 250 pb y el de la amplificación del gen de actina de 103 pb. Carril 1: marcador de 100 pb; Carriles 2 y 3: tejido foliar, y Carril 6 fruto de árboles sanos; Carriles 4 y 7: hoja y fruto de árboles asintomáticos; Carriles 5 y 8: hoja y fruto de árboles con síntomas visibles. La banda correspondiente al viroide se expresa sólo en árboles infectados.
Figure 1. Detection of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) in avocado. Amplified products using duplex one-step RT-PCR. Tissues that tested positive for ASBVd show two products, one that belongs to the 250 bp viroid, and one from the amplification of the 103 bp actin gene. Lane 1, 100 bp marker; Lanes 2 and 3, healthy leaf samples; Lane 4 and 7, leaf and fruit samples from asymptomatic trees; Lane 6, fruit sample from healthy tree; Lanes 5 and 8, leaf and fruit samples from trees with visible symptoms. The band corresponding to the viroid is expressed only in infected trees.

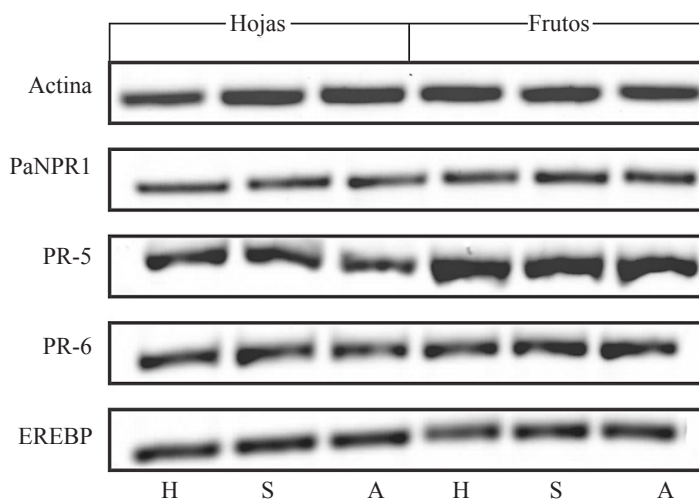


Figura 2. Productos de la amplificación de genes de defensa. Los primeros tres carriles corresponden a tejido foliar, los tres restantes a tejido de frutos. H, sano; S, sintomático; A, asintomático.
Figure 2. Amplification products from defense genes. The first three lanes correspond to leaf tissues, and the other three to fruit tissue. H, healthy; S, symptomatic; A, asymptomatic.

del efecto de la infección del ASBVd se realizaron entre árboles con síntomas y árboles asintomáticos, con respecto al sano. Los datos de área y porcentaje calculados por ImageJ® se usaron para obtener densidades relativas de cada banda y se ajustó al nivel de expresión del gen de actina usado como referencia (Figura 3).

among infected, symptomatic or asymptomatic trees, nor regarding their basal expression on healthy tissue (Figures 3A and 3B). *PR-5* expression on asymptomatic trees is over-expressed and significantly different from expression of symptomatic trees and basal expression, while fruits from symptomatic trees did not show any

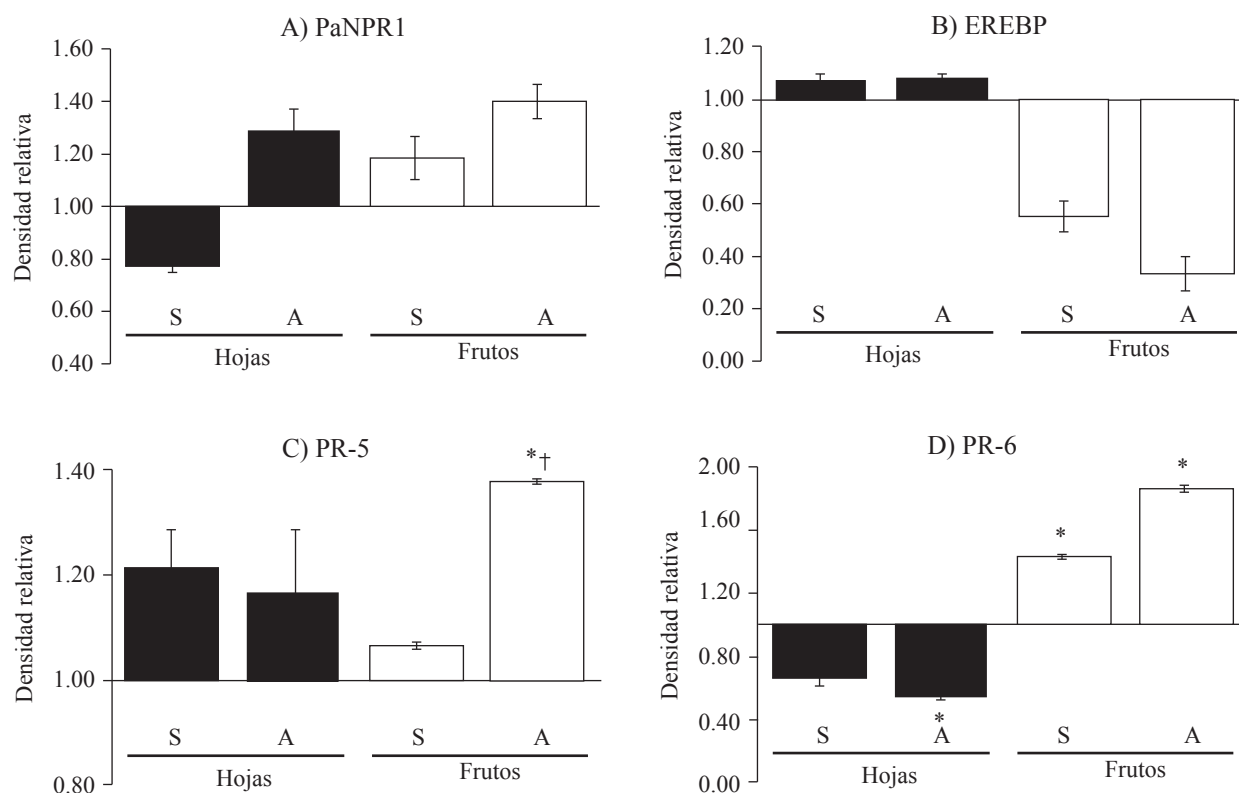


Figura 3. Análisis cuantitativo de las intensidades de los productos de la RT-PCR de los genes relacionados con defensa. Se muestran los promedios de las densidades relativas ajustadas, los cambios en la intensidad son negativos o positivos a partir del valor de la expresión basal asignada como 1. La línea vertical sobre cada barra representa el error estándar (n=3). S, tejido de árbol con síntomas; A, tejido de árbol sin síntomas; *, diferencia significativa con respecto al tejido sano; †, diferencia significativa entre sintomático y asintomático.

Figure 3. Quantitative analysis of band intensity from RT-PCR bands for defense-related genes. The average of the adjusted relative densities is shown; changes in intensity are negative or positive depending on the value of the basal expression assigned as 1. Vertical lines on each bar represent the standard error (n=3). S, tissue of trees with symptoms; A, tissue of asymptomatic trees; *, significant difference in relation to healthy tissue; †, significant difference between symptomatic and asymptomatic.

Los genes *PaNPR1* y *EREBP* no mostraron diferencias significativas en la expresión diferencial entre los árboles infectados, con síntomas y asintomáticos, ni con respecto a la expresión basal en los tejidos sanos (Figuras 3A y 3B). La expresión de *PR-5* en el fruto de árbol asintomático está sobre-regulada y es significativamente diferente a la de fruto de árbol con síntomas y a la expresión basal, mientras que en los frutos de árbol con síntomas no se encontraron diferencias con la expresión basal (Figura 3C). En las hojas no se encontraron diferencias en la

diferencia from basal expression (Figure 3C). No expression differences were found in leaves from symptomatic and asymptomatic trees, nor in the basal expression. The expression of *PR-6* on fruit infected by ASBVd was up-regulated and, although it increased in asymptomatic fruits, no difference was observed on fruits from symptomatic trees (Figure 3D). As for leaf tissue, a significant down-regulation was observed on asymptomatic trees.

It is documented that changes in *NPR1* gene expression induce changes in *PR-5* expression

expresión entre árboles sintomáticos y asintomáticos, ni con respecto a la expresión basal. La expresión de *PR-6* en frutos infectados con ASBVd tuvo regulación positiva, y, a pesar de su incremento en frutos asintomáticos, no se observó diferencia con los frutos de árboles con síntomas (Figura 3D). En el caso del tejido foliar se observó una regulación negativa significativa en los árboles asintomáticos.

La expresión de genes *NPR1* pueden inducir la expresión de *PR-5* (Shah *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados sugieren que los cambios de expresión de *PR-5* en tejidos infectados por ASBVd no fueron 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 que la expresión constitutiva basal de *PaNPR1* fue 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*, los autores encontraron una regulación negativa de *PaNPR1* en el tratamiento con ácido salicílico a las 12h después de la aplicación, lo que sugiere una función alternativa en las respuestas de defensa.

Por otro lado, se sabe que los viroides pueden inactivar algunos factores de transcripción, incluyendo *EREBP*, generalmente al suprimir las vías de regulación de los mRNA asociados a ellos (Matoušek *et al.*, 2015; Katsarou *et al.*, 2016). En esta investigación no hubo diferencias en la expresión de *EREBP*. 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, éste tiene limitada participación en el desarrollo de síntomas inducido por viroides (Hu *et al.*, 2011), lo cual es consistente con los resultados obtenidos.

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

(Shah *et al.*, 2001). However, results in this research suggest that changes in *PR-5* expression on tissue infected by ASBVd were not produced by changes in *PaNPR1* expression because it did not change significantly from basal. Backer *et al.* (2015) reported that *PaNPR1* constitutive expression was higher on leaves than on unripe fruits. Additionally, and contrary to documented reports on *NPR1* activation by salicylic acid, they found *PaNPR1* down-regulation 12 h after salicylic acid treatment; this behavior suggests an alternative function for defense responses.

On the other hand, it is known that viroids can inactivate some transcription factors, including *EREBP*, usually by suppressing regulation ways of mRNA associated with them (Matoušek *et al.*, 2015; Katsarou *et al.*, 2016). In this research, no differences were found in *EREBP* expression. Although ethylene is a common hormone that can simulate a pathogens attack and favor the expression of some PR proteins, it has a limited involvement in the development of symptoms induced by viroids (Hu *et al.*, 2011), a fact that is consistent with the obtained results.

As for induction by *PR-5* and *PR-6* genes, the results in this research suggest that the mechanism that activates *PR* genes expression acts as a non-specific coordinated set of genes that varies in magnitude and can stop the primary infection (Fister *et al.*, 2016). The expression of *PR-5* on fruit from asymptomatic trees was high compared with that on other tissues, which suggest that this organ has a more active defense mechanism. The expression of *PR-5* genes may occur by the action of abscisic acid, ethylene, salicylate, methyl jasmonate or any other elicitor (Velazhahan *et al.*, 1999). Therefore, *PR-5* induction in fruits from asymptomatic trees may have resulted from the activation of another signaling messenger different from ethylene, which would also explain why the *EREBP* transcription

PR funciona como un conjunto de genes coordinado, no específico, que varía en magnitud y puede llegar a detener la infección primaria (Fister *et al.*, 2016). La expresión de *PR-5* en frutos de árboles asintomáticos fue elevada en comparación con la de los otros tejidos, lo cual sugiere una respuesta de defensa más activa en este órgano. La expresión de los genes *PR-5* puede ocurrir por la acción de ácido abscísico, etileno, salicilato, metil jasmonato o algunos otros elicitores (Velazhahan *et al.*, 1999). Consecuentemente, es posible que la inducción de *PR-5* en frutos de árboles asintomáticos se deba a la activación por la señalización de otro mensajero diferente al etileno, lo cual explicaría también por qué el factor de transcripción *EREBP* no cambió sus niveles de expresión (Figura 3B). Sin embargo, la expresión de *PR-5* depende del tipo de patógeno, ya que la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* no modificó su nivel de expresión (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013).

La expresión de *PR-6* tuvo una regulación positiva en los frutos, similar a lo que ocurrió con *PR-5*. Las proteínas *PR-6* pertenecen al grupo de inhibidores de proteasas reportadas en una gran variedad de plantas respondiendo a diversos estímulos externos incluyendo heridas, alimentación por insectos e infecciones microbiales (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). Debido a la escasa expresión de *EREBP* en los frutos de árboles asintomáticos, la expresión de *PR-6* en éstos parece relacionada con la inducción por ácido jasmónico o a través de una ruta alterna (Koiwa *et al.*, 1997).

Este estudio establece las bases para plantear diversas rutas de defensa del aguacate que son inducidas por la infección del ASBVd. Los cuatro genes

factor did not change its expression level (Figure 3B). However, the expression of *PR-5* depends on the type of pathogen, since *Colletotrichum gloeosporioides* infection did not modify its expression level (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013).

PR-6 expression was up-regulated on fruits like *PR-5*. *PR-6* proteins belong to the group of protease inhibitors reported to be present in an extensive range of plants that respond to diverse external stimuli, including wounds, insect-feed and microbial infections (Habib and Fazili, 2007; Turra and Lorito, 2011). The expression of *PR-6* can be regulated by ethylene and activated in leaves during fruit ripening (Margossian *et al.*, 1988); it can also be induced by exogenous applications of methyl jasmonate and abscisic acid (Wang *et al.*, 2003). Given the poor *EREBP* expression on fruits from asymptomatic trees, the expression of *PR-6* on them seems to be associated with induction by jasmonic acid or through an alternate route (Koiwa *et al.*, 1997).

This study sets the basis to further explore diverse defense routes in avocado that are induced by ASBVd infection. The four studied genes showed differential expression, both in leaf tissue and fruit tissue from healthy trees and infected with ASBVd. The more significant changes in expression were recorded in fruits from asymptomatic trees with *PR-5* and *PR-6*. In contrast, in leaf tissue from asymptomatic trees only the *PR-6* basal expression was modified.

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

estudiados presentaron expresión diferencial, tanto en tejido foliar como en tejido de fruto de árboles sanos como infectados con ASBVd. Los cambios más significativos en la expresión se dieron en frutos

de árboles asintomáticos en los genes *PR-5* y *PR-6*. En cambio, en tejido foliar únicamente se modificó la expresión basal de *PR-6* en árboles asintomáticos.

## LITERATURA CITADA

- Aranda PS, LaJoie DM and Jorcyk CL. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33: 366–369. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Backer R, Mahomed W, Reeksting BJ, Engelbrecht J, Ibarra-Laclette E and van den Berg NN. 2015. Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana* (Mill.). *Frontiers in Plant Science* 6: 300. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00300>
- Beltrán-Peña H, Soria-Ruiz J, Téliz-Ortiz D, Ochoa-Martínez DL, Nava-Díaz C y Ochoa-Ascencio S. 2014. Detección satelital y molecular del viroide de la mancha de sol del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd). *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 21–29. Disponible en línea: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/37-1/2a.pdf>
- Desjardins P. 1987. *Avocado sunblotch*. Pp. 299–313. In: Diener TO (eds.). *The Viroids*. Springer. Boston, MA., USA. 344p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2\\_18](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2_18)
- Di Serio F, De Stradis A, Delgado S, Flores R and Navarro B. 2013. Cytopathic effects incited by viroid RNAs and putative underlying mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 3: 288. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00288>
- Djami-Tchatchou AT, Straker CJ and Allie F. 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01925.x>
- Djami-Tchatchou AT, Allie F and Straker CJ. 2013. Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *South African Journal of Botany* 86: 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.02.166>
- Fister AS, Mejia LC, Zhang Y, Herre EA, Maximova SN and Gultinan MJ. 2016. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC Genomics* 17: 363. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2693-3>
- Habib H and Fazili KM. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68–85. Disponible en línea: <http://www.academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/8EB195410993>
- Hu XX, Nie XZ, Song Y, Xiong XY and Tai H. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60035-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60035-7)
- Katsarou K, Wu Y, Zhang R, Bonar N, Morris J, Hedley PE, Bryan GJ, Kalantidis K and Hornyik C. 2016. Insight on genes affecting tuber development in potato upon Potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection. *PLoS ONE* 11: e0150711. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150711>
- Koiwa H, Bressan RA and Hasegawa PM. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2: 379–384. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)90052-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(97)90052-2)
- Mahomed W and Van den Berg N. 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biology* 11: 167. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-167>
- Margossian LJ, Federman AD, Giovannoni JJ and Fischer RL. 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. Disponible en línea: <http://www.pnas.org/content/85/21/8012.full.pdf>
- Matoušek J, Piernikarczyk RJ, Týcová A, Duraisamy GS, Kocábek T and Steger G. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.001>
- Reeksting BJ, Coetzer N, Mahomed W, Engelbrecht J and Van Den Berg N. 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. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086399>
- Saucedo-Carabez JR, Téliz-Ortiz D, Ochoa-Ascencio S, Ochoa-Martínez D, Vallejo-Pérez MR and Beltrán-Peña H. 2014. Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on avocado yield in Michoacan, Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 138: 799–805. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0354-9>
- Saucedo-Carabez JR, Téliz-Ortiz D, Ochoa-Ascencio S, Ochoa-Martínez D, Vallejo-Pérez MR and Beltrán-Peña H. 2015. Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on the postharvest quality of avocado fruits from Mexico. *Journal of Agricultural Science* 7: 85–92. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v7n9p85>
- Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schnell R, Kuhn D, Ronning CM and Harkins D. 1997. Application of RT-PCR for indexing *Avocado sunblotch viroid*. *Plant Disease* 81: 1023–1026. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.1023>
- Semancik JS and Szychowski JA. 1994. *Avocado sunblotch disease*: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75: 1543–1549. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-75-7-1543>
- Shah J, Kachroo P, Nandi A and Klessig DF. 2001. A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance

- against bacterial and oomycete pathogens. *The Plant Journal* 25: 563–574. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00992.x>
- Turra D and Lorito M. 2011. Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. *Current Protein and Peptide Science* 12: 374–85. <http://dx.doi.org/10.2174/138920311796391151>
- Vallejo-Pérez MR, Téliz-Ortiz D, Colinas-León MT, De La Torre-Almaraz R, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D and Ochoa-Martínez DL. 2015. Alterations induced by Avocado sunblotch viroid in the postharvest physiology and quality of avocado “Hass” fruit. *Phytoparasitica* 43: 355–364. <http://dx.doi.org/10.1007/s12600-015-0469-y>
- Vallejo-Pérez MR, Téliz-Ortiz D, De La Torre-Almaraz R, Valdovinos-Ponce G, Colinas-León MT, Nieto-Ángel D and Ochoa-Martínez DL. 2014. Histopathology of avocado fruit infected by Avocado sunblotch viroid. *Journal of Agricultural Science* 6: 158–65. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v6n9p158>
- Vallejo-Pérez MR, Téliz-Ortiz D, De La Torre-Almaraz R, López-Martínez JO, Nieto-Ángel D. 2017. Avocado sunblotch viroid: pest risk and potential impact to Mexico. *Crop Protection* 99:118-127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.015>
- Velazhahan R, Datta SK and Muthukrishnan S. 1999. The PR-5 Family: Thaumatin-like Proteins. Pp107-129 In: Datta SK and Muthukrishnan S (eds.). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 291p. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420049299.ch5>
- Wang HY, Huang YC, Chen SF and Yeh KW. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00158-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00158-4)