



# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**"IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA  
A *Phytophthora cinnamomi* Rands EN PLANTAS  
MICROPROPAGADAS DE AGUACATE CRIOLLO  
MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*)"**

**TESIS QUE PRESENTA:**

**M.C. MARCO ANTONIO CORTÉS RODRÍGUEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA OPCIÓN DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ASESOR:**

**DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**CO-ASESOR:**

**DR. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ**

**Morelia, Michoacán, México**

**Diciembre, 2011**

*EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UMSNH, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA Y DEL DR. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ. FORMA PARTE DE LA LGAC “PROPAGACIÓN, CONSERVACIÓN Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS” DEL CUERPO ACADÉMICO BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS (UMSNH-CA-155).*

---

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS creador del universo y dueño de mi vida que me permite construir otros mundos mentales posibles.

Al CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por la beca otorgada como apoyo para la realización del presente proyecto.

A las autoridades de la UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.

A los profesores-investigadores del INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS, por ser parte fundamental en mi formación académica.

Al LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, por el apoyo brindado en la realización de mi tesis profesional

En especial a mi asesor, al DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA, gracias por su infinita paciencia y ayuda en este trabajo, por haber sembrado en mí la semilla de la investigación, por sus consejos, por confiar en mí, pero sobre todo por su amistad brindada.

A mi comité tutorial integrado por: DR. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ co-asesor de tesis, al DR. JESÚS CAMPOS GARCÍA, a la DRA. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVIA Y AL DR. IGNACIO VIDALES FERNÁNDEZ por sus acertadas sugerencias y observaciones para la conclusión final de la presente investigación, mi sincero agradecimiento

A mis asesores externos DR. MAURO M. MARTÍNEZ PACHECO y al DR. JOSÉ DE LA LUZ SÁNCHEZ PÉREZ, gracias por sus acertadas y valiosas sugerencias.

A la M.C. MARTHA PATRICIA CHÁVEZ MOCTEZUMA, quien me apoyó y me tuvo la paciencia necesaria con sus opiniones para mejorar este trabajo.

A mis COMPAÑEROS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL; Ale, Luis Ma., Rodo, Rafa, Wendy, Jazmín, Cristóbal, Elmar y Edgar.

Al PERSONAL ADMINISTRATIVO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS; en especial a Vicky, Isa, Martha, Blanca y Rosy, gracias por ser parte de este gran sueño.

---

## DEDICATORIA

TAL VEZ EN EL DINERO ENCUENTRES UN POCO DE FELICIDAD, EN LAS AMISTADES ENCUENTRES ALEGRÍAS, EN LAS MEDICINAS LA CURA PARE TU ENFERMEDAD, PERO EL AMOR SOLO LO ENCONTRARAS EN TU FAMILIA. PARA MI ESPOSA, HIJAS Y NIETO:

MARTHA

CYNTHIA

JESSICA

SANTI

QUIENES TUVIERON EL TIEMPO Y LA PACIENCIA SUFICIENTE PARA APOYARME PROFUNDAMENTE, DÁNDOME SU COMPRESIÓN, SU CARIÑO Y SU AMOR. GRACIAS POR HACER DE ESOS MOMENTOS UN VERDADERO VIVIR.

---

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>I. RESUMEN</b>	<i>iv</i>
<b>II. ABSTRACT</b>	<i>vi</i>
<b>III. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
<b>IV. ANTECEDENTES</b>	3
4.1 AGUACATE ( <i>Persea americana</i> Miller)	3
4.1.1 Origen y razas ecológicas	3
4.1.2. Enfermedades del aguacate	4
4.2. TRISTEZA DEL AGUACATERO	6
4.2.1. <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands (1922)	6
4.2.1.1. Phylum Oomycota	7
4.2.1.2. Familia Pythiaceae	8
4.2.1.3. Género <i>Phytophthora</i>	9
4.2.2. Ciclo de la enfermedad y epidemiología	11
4.3. LA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA COMO UNA ALTERNATIVA PARA LA SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE CON TOLERANCIA A <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	15
<b>V. JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	17
<b>VII. OBJETIVOS</b>	18
7.1. OBJETIVO GENERAL	18
7.1.1. Objetivos específicos	18

	<b>Pág.</b>
<b>VIII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA</b>	19
<b>IX. RESULTADOS</b>	20
<b>CAPÍTULO I.</b> PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO ( <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> )	20
<b>CAPÍTULO II.</b> EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A <i>Phytophthora cinnamomi</i> EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> )	27
<b>CAPÍTULO III.</b> IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN GENOTIPOS DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) TOLERANTES A <i>Phytophthora cinnamomi</i>	37
<b>CAPÍTULO IV.</b> EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN UN GENOTIPO DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) TOLERANTE A <i>Phytophthora cinnamomi</i>	54
<b>X. DISCUSIÓN GENERAL</b>	67
10.1 MICROPROPAGACIÓN DE GENOTIPOS DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO	67
10.2. PRUEBAS DE TOLERANCIA A <i>P. cinnamomi</i>	68
10.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE DEFENSA	69
10.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE DEFENSA	70
<b>XI. CONCLUSIÓN GENERAL</b>	75
<b>XII. LITERATURA ADICIONAL</b>	76
<b>ANEXOS</b>	82

		<b>Pág.</b>
<b>ANEXO 1.</b>	Carta de aceptación de artículo (Capítulo I)	83
<b>ANEXO 2.</b>	Secuencia en el NCBI del gen <i>PR5</i> de aguacate criollo mexicano	84
<b>ANEXO 3.</b>	Carta de aceptación de publicación de secuencias en el NCBI de los genes <i>chs</i> , <i>pal</i> y <i>stk</i> de aguacate criollo mexicano.	85

## I. RESUMEN

En esta investigación se determinó la tolerancia a *P. cinnamomi* de tres genotipos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), AMUM-064, AMUM-765 y AMUM-773, los cuales fueron micropropagados a partir de explantes de árboles del Banco de Germoplasma de Aguacate del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Uruapan, Michoacán, México). Mediante las técnicas de PCR y qRT-PCR se analizó la presencia y expresión de genes candidatos responsables de la tolerancia a *P. cinnamomi*.

La micropropagación de los tres genotipos se estableció con la siembra de yemas axilares de árboles adultos, en el medio basal MS (Murashige y Skoog) con 30 g/L sacarosa, 1 g/L carbón activado, 0.4 mg/L ácido ascórbico, 1 g/L de fungicida comercial Tecto 60, solidificado con 4 g/L de phytigel. En este medio se logró la proliferación y elongación de 1-2 brotes/explante a los 45 días del cultivo. Para la multiplicación de brotes, se evaluó la respuesta *in vitro* subcultivando los brotes en MS con benciladenina (BA) a 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 ó 5.0 mg/L en combinación con ácido indol-3-butírico (AIB) a 0, 0.1, 0.25, 0.5 ó 1.0 mg/L. La inducción de brotes se observó en un 71.3%, produciendo de 3-5 brotes por explante a los 90 días del cultivo, en MS con 0.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de AIB. Para la formación de plántulas, los brotes fueron enraizados en MS con 0.5 mg/L AIB después de 90 días de cultivo, las plántulas micropropagadas fueron exitosamente aclimatadas y cultivadas en invernadero, manteniéndose bajo irrigación cada tres días y fertilización cada tres meses.

Para evaluar la tolerancia a *P. cinnamomi* en estos tres genotipos de aguacate criollo mexicano, plántulas de tres meses de edad bajo cultivo *in vitro* y de 12 meses de edad cultivadas en invernadero, fueron desafiadas al ataque de este oomiceto. La inoculación se realizó sumergiendo el sistema radical de cada planta en una suspensión de  $2 \times 10^4$  zoosporas/mL durante tres horas, para posteriormente trasplantarlas a suelo estéril, permitiendo la saturación del suelo con agua. Después de la inoculación, las plántulas de tres meses de edad fueron mantenidas en condiciones asépticas y las de 12 meses de edad, bajo condiciones de invernadero. A los 8 y 15 días del cultivo se determinaron los porcentajes de mortalidad y de pudrición de la raíz. En plántulas de tres meses de edad, 15 días después de la inoculación, las plántulas del genotipo AMUM-064 mostraron un 100% de mortalidad, mientras que las de los genotipos AMUM-765 y AMUM-773 presentaron un 30% y 10% de mortalidad, respectivamente. Una respuesta similar fue observada en plantas de 12 meses de edad, cultivadas en invernadero, AMUM-064 tuvo un 100% de mortalidad y las plántulas de los genotipos AMUM-765 y AMUM-773, mostraron un 40% y 10% de mortalidad, respectivamente. Con estos resultados, se determinó la susceptibilidad a *P. cinnamomi* de las plántulas del genotipo AMUM-064 y la tolerancia de los genotipos AMUM-765 y AMUM-773, considerándose a este último como el más tolerante. El porcentaje de la pudrición de las raíces fue más bajo en los genotipos tolerantes (AMUM-765 y AMUM-773), mientras que en las plantas inoculadas del genotipo susceptible (AMUM-064), se observó un 100% de pudrición.

Con el propósito de determinar la presencia de genes de defensa en los genotipos de aguacate bajo estudio, se diseñaron oligonucleótidos degenerados de genes de resistencia (*Cyp*, *LM6* y *Rps2*) y genes relacionados a patogénesis (genes *PR*) (*chs*, *pal*, *pg*, *PR5* y *stk*). Utilizando el método de PCR, estos genes fueron amplificados en los genotipos de aguacate criollo mexicano (AMUM-064, AMUM-765 y AMUM-773). Para confirmar la identificación, se realizó su secuenciación y mediante el análisis informático con la herramienta Blast fueron comparados con la base de datos, dando como resultado la identificación de los genes *PR*, *chs*, *pal*, *stk* y *PR5*, en los tres genotipos de aguacate en estudio.

Una vez identificados algunos genes candidatos de resistencia de aguacate a *P. cinnamomi*, se evaluó la expresión de los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk* en plántulas de 12 meses de edad bajo cultivo en invernadero, del genotipo susceptible (AMUM-064) y del genotipo tolerante (AMUM-773), inoculados con  $2 \times 10^4$  zoosporas/mL de *P. cinnamomi*. La extracción de ARN total se obtuvo en raíces de las plántulas inoculadas, a 0, 2, 8, 24 y 48 h después de la inoculación. Para determinar la expresión de estos genes a través de un análisis RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR), se utilizaron cebadores específicos de los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk*, implementándose la cuantificación del transcrito. Los resultados mostraron una expresión diferencial principalmente de los genes *chs* y *pal*, con valores mayores en las plantas tolerantes (AMUM-773) que en las susceptibles (AMUM-064), donde la expresión de ambos genes es mínima. Estos resultados demuestran que ambos genes están implicados con la tolerancia de las plántulas del genotipo AMUM-773 a *P. cinnamomi*. Esta investigación supone el primer paso para la selección de genotipos de aguacate criollo mexicano, con alto grado de tolerancia a *P. cinnamomi*.

## II. ABSTRACT

This research identified the tolerance to *P. cinnamomi* of three genotypes of avocado Mexican race (*P. americana* var. *drymifolia*), AMUM-064, AMUM-765 and AMUM-773, which were micropropagated from tree explants of the avocado Bank of germplasm of INIFAP-Uruapan (Michoacan, Mexico). Using PCR and qRT-PCR techniques analyzed the presence and expression of candidate genes responsible for tolerance to *P. cinnamomi*.

The micropropagation of the three genotypes was established from axillary buds of adult trees, in the basal MS (half strength) (Murashige and Skoog) with 30 g/L sucrose, 1 g/L activated charcoal, 0.4 mg/L acid ascorbic, 1 g/L commercial fungicide Tecto 60, solidified with 4 g/L of phytigel. Proliferation and elongation of 1-2 shoot/explant to the 45 days of cultivation was achieved in this medium. For the multiplication of shoots, assessed the response *in vitro* subculturing the shoots in MS with benzyladenine (BA) to 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 mg/L in combination with indole-3-butyric acid (IBA) to 0, 0.1, 0.25, 0.5 or 1.0 mg/L. Induction of shoots was observed in a 71.3%, producing 3-5 shoots/explant to the 90 days of the cultivation in MS with 0.5 mg/L of BA and 0.1 mg/L of IBA. For the formation of plantlets, the shoots were rooted in MS with 0.5 mg/L IBA after 90 days of cultivation, the micropropagated plantlets were successfully acclimatized and grown in the greenhouse, keeping them under irrigation every three days and fertilization every three months.

To evaluate the tolerance to *P. cinnamomi* in these three genotypes of avocado Mexican race (AMUM-064, AMUM-765 and AMUM-773), three-month-old plantlets and 12-month-old acclimatized and greenhouse cultivated plants, were inoculated by submersion in *P. cinnamomi* zoospore suspension ( $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ) during three hours. Inoculated plants were transplanted to sterile soil that was saturated with water. After inoculation, 3-month-old *in vitro* propagated plantlets were kept under aseptic conditions and 12-month-old acclimatized plants were kept in the greenhouse. Plant mortality and root rot percentages were recorded 8 and 15 days after inoculation. In plantlets of accession AMUM-064, the mortality was 100% 15 days after inoculation, while those from accessions AMUM-765 and AMUM-773 only showed a mortality of 30% and 10%, respectively. At the latter time after inoculation, plants of accessions AMUM-765 and AMUM-773 displayed 40% and 10% mortality, respectively, while those of accession AMUM-064 showed 100% mortality. Percentage of root rot was much lower on tolerant (accessions AMUM-765 and AMUM-773), while 100% root rot occurred in inoculated plants of the susceptible genotype (AMUM-064).

Degenerate oligonucleotides of resistance genes (*Cyp*, *LM6* and *Rps2*) and genes related to pathogenesis (genes *PR*) were designed with the purpose of determining the presence of genes of defence in the genotypes of avocado under study (*chs*, *pal*, *pg*, *PR5*, and *stk*). Using PCR method, these genes were amplified in the genotypes of avocado Mexican race (AMUM-064, AMUM-765 and AMUM-773). The sequencing was conducted to confirm the identification, and through computer analysis with the Blast tool they were compared with the database, resulting in the

identification of genes *PR*, *chs*, *pal*, *stk*, and *PR5* in the three genotypes of avocado in study.

Once identified some candidate resistance genes of avocado to *P. cinnamomi*, the expression of genes *chs*, *pal*, *PR5*, and *stk*, was evaluated in 12- months-old plants genotypes grown in greenhouse, of susceptible (AMUM-064) and tolerant (AMUM-773), inoculated with  $2 \times 10^4$  zoospores/mL of *P. cinnamomi*. Extraction of total RNA was obtained in roots of inoculated plants at 0, 2, 8, 24 and 48 h after inoculation. The expression of these genes through a quantitative RT-PCR analysis (qRT-PCR), was determined using oligonucleotide primers of specific genes of *chs*, *pal*, *PR5* and *stk*, implementing the quantification of the transcript. The results showed a differential expression mainly of *chs* and *pal* genes, with higher values in the tolerante plants (AMUM-773) that in susceptible plants (AMUM-064), in these plants, the expression of both genes is minimal.

These results show that both genes are involved with the tolerance of genotype AMUM-773 plants to *P. cinnamomi*. This research is the first step for the selection of genotypes of avocado Mexican race, with high degree of tolerance to *P. cinnamomi*.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es en la actualidad uno de los cultivos más importantes en México, no solo por la cantidad de toneladas producidas que lo ubica como el productor más importante a nivel mundial, sino también porque es un cultivo que genera empleos directos e indirectos y es un ingreso importante de divisas por la exportación de su fruto. México tiene el primer lugar tanto de productor como de exportador mundial de aguacate Hass (*P. americana* Mill. Cv. Hass) y (SAGARPA, 2007; Téliz y Marroquín, 2007).

En la región aguacatera del estado de Michoacán, México, los árboles de aguacate en huertos comerciales, en específico los del cultivar Hass, tienen como portainjertos al aguacate criollo (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*). De esta manera, los productores enfrentan dos tipos de problemas fitosanitarios diferentes, unos que afectan selectivamente al portainjerto y otros que afectan solamente a la variedad injertada (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001). Aunque aparentemente no existe la necesidad de utilizar portainjertos específicos, éstos proveen al árbol mayor soporte y adaptación al suelo, cierta tolerancia al estrés hídrico o de salinidad, además de la resistencia a algunos patógenos de la raíz como lo es el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Este oomiceto es el agente causal de la enfermedad más destructiva en los huertos de aguacate en todo el mundo y ha sido el factor económicamente limitante a la producción en países tales como Australia, México, Sudáfrica y EUA y mas de setenta países (Pegg *et al.*, 2002). En México, el oomiceto se ha detectado en las regiones productoras de aguacate de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit, y Morelos (Vidales y Alcántar, 1999).

Debido al corto período entre generaciones y a su gran capacidad reproductiva, este oomiceto tiene la habilidad de causar la muerte masiva de las raíces finas

alimentadoras de sus hospederos, bajo condiciones de suelo húmedo o con excesivo contenido de agua. El control de este patógeno ha requerido de una combinación de varias prácticas de manejo diseñadas para reducir el daño que ocasiona e incrementar la tolerancia del hospedero durante los períodos críticos de infección. Las prácticas complementarias de manejo incluyen la prevención, el control químico y biológico y el uso de portainjertos resistentes (Coffey y Guillemet, 1987; Erwin y Ribeiro, 1996). El mejor control se lleva a cabo cuando todas esas estrategias se usan en un sistema de manejo integrado, aunque la selección o generación de genotipos resistentes es una de las estrategias promisorias para el control de *P. cinnamomi* (Menge *et al.*, 1992).

Debido a la necesidad de seleccionar portainjertos de aguacate criollo mexicano resistentes a *P. cinnamomi* del banco de germoplasma (INIFAP Uruapan), se seleccionaron genotipos con potencial tolerancia al oomiceto. Estos requieren ser evaluados y caracterizados para determinar la posible fuente de resistencia. Una alternativa es a través de la identificación de genes candidatos que confieren resistencia a este oomiceto.

Es por ello, que en el presente trabajo se evaluó la tolerancia de tres genotipos de aguacate criollo mexicano contra el oomiceto *P. cinnamomi*, utilizando plantas propagadas mediante técnicas de cultivo *in vitro* (micropropagación), las cuales fueron sometidas a pruebas de tolerancia al oomiceto, aplicando zoosporas en el sistema radical de éstas. Una vez que se determinó la tolerancia en los genotipos bajo estudio, además de identificar genes de defensa en dichos genotipos, se analizó la expresión diferencial de algunos de los genes identificados, realizando ensayos de interacción aguacate-*P. cinnamomi*.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1. AGUACATE (*Persea americana* Miller)

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es uno de los cultivos más importantes en México, ya que es el principal productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2005). Además, es un cultivo que genera más de 100 mil empleos directos e indirectos y permite un ingreso importante de divisas por la exportación de su fruta. Por otra parte, nuestro país forma parte del centro de origen de la especie.

El aguacate pertenece a la familia Lauraceae, una de las más antiguas en nuestro planeta. Comprende poco más de 50 géneros y unas 2,200 especies. De esta familia se deriva el género *Persea*, el cual tiene dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne*. El aguacate se clasifica dentro del género *Persea* y subgénero *Persea*. En el subgénero *Persea* se reconocen tres especies: *P. americana* Mill., *P. schiedeana* Nees, y *P. parvifolia* Williams. La mayoría de los miembros reconocidos del subgénero *Persea* se encuentran principalmente en una misma área que inicia del centro de México hasta Panamá en Centroamérica. Los hallazgos de aguacates primitivos desde la Sierra Madre Oriental en el estado de Nuevo León, México, hasta Costa Rica en Centroamérica, apoyan la suposición de que se trata de un centro de origen del aguacate, y probablemente de todo el subgénero *Persea* (Bergh, 1992).

#### 4.1.1. Origen y razas ecológicas

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie arbórea polimórfica que aparentemente se originó en una amplia área geográfica extendiéndose desde las tierras altas del centro y oriente de México, pasando a través de Guatemala, hasta la costa del Océano Pacífico en Centroamérica. Las evidencias arqueológicas indican que esta fruta se utilizó y se seleccionó en México desde hace unos

10,000 años (Smith, 1966, 1969). Desde antes de la llegada de los Europeos, se habían seleccionado durante milenios formas hortícolas considerablemente mejoradas sobre sus tipos silvestres. Éstas estuvieron entre tres taxones distintos o subespecies, ecológicamente separadas, conocidas ahora como razas Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Smith, 1966, 1969; Storey *et al.*, 1986).

Como resultado de la amplia distribución del germoplasma de aguacate hacia regiones distantes de sus sitios de origen, ocurrió un considerable cruzamiento interracial, a tal grado que en la actualidad los cultivares económicamente importantes tanto en áreas tropicales como subtropicales donde se cultivan, son resultado de la hibridación entre razas (Knight, 2002).

Por miles de años el aguacate se ha utilizado no solo como alimento, sino también como condimento, fuente de productos maderables y en la medicina tradicional. En la actualidad el aceite de aguacate es el segundo producto industrializado, con un amplio uso culinario y para la elaboración de cosméticos (Olaeta, 2003).

#### **4.1.2. Enfermedades del aguacate**

El aguacate presenta enfermedades severas que en casos extremos provocan la muerte del árbol y en general, una disminución en la producción que varía del 10 al 40%, y una reducción en la calidad entre un 15 y 30%. Las enfermedades de mayor importancia económica son seis y a continuación se mencionan por su nombre común y el o los microorganismos que las causan: la antracnosis del fruto, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz; la roña del fruto, *Sphaceloma persea* Jenkins; anillamiento del fruto causado por el complejo de bacterias y hongos, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Clavibacter* (*Corynebacterium*) sp., *Alternaria* sp., *Diplodia* sp., *Dothiorella* sp. y *Pestalotia* sp.; la tristeza o pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*; el cáncer de tronco y ramas, *Fusarium episphaeria* Snyder y Hansen; y enfermedades de poscosecha, *Diplodia natalensis*

Pole evans, *Rhizopus nigricans* Ehr., *Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium roseum*, *C. gloeosporioides* Penz y *S. perseae* Jenkins (Sánchez-Pérez, 2001).

La enfermedad más devastadora del cultivo de aguacate a nivel mundial es la producida por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* que ataca la raíz del árbol, conocida como “tristeza del aguacatero” o “podrición de la raíz”, el cual se debilita y generalmente muere. Se ha reportado esta enfermedad del aguacate en unos 70 países (Pegg *et al.*, 2002).

Se considera que el control de esta enfermedad debe ser integral, combinando el control químico con fungicidas, las podas severas al follaje, la adición de materia orgánica al suelo, un drenaje óptimo, para evitar los excesos de humedad en el ambiente donde se desarrollan las raíces. El control integral resulta demasiado caro y generalmente antieconómico, por esta razón es primordial la búsqueda del control genético a través de portainjertos resistentes al ataque del oomiceto ya que se considera que es la mejor alternativa en el largo plazo (Kamoun *et al.*, 1999; Zilberstaine y Ben-Ya'akov, 1999).

De las tres variedades de aguacate utilizadas como portainjertos, la Mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) ha mostrado tener una mayor tolerancia e incluso resistencia moderada a *P. cinnamomi* (Zentmyer y Lewis, 1976; Zentmyer, 1978; Coffey, 1987) y esta es la razón por la cual se utiliza esta variedad para injertar los cultivares comerciales como el ‘Hass’. Con la excepción de México, de manera general el uso de portainjertos de reproducción clonal tolerantes a la enfermedad, es en la actualidad una práctica cada vez más común. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son muy favorables al desarrollo del oomiceto, incluso esos portainjertos pueden ser severamente afectados por el patógeno.

## 4.2. TRISTEZA DEL AGUACATERO

La tristeza del aguacatero es la enfermedad de mayor importancia y ampliamente distribuida a nivel mundial. El agente causal, *Phytophthora cinnamomi* Rands (1922), fue aislado por primera vez de árboles de canela (*Cinnamomum burmannii* Blume) en Sumatra en 1922 y desde ese tiempo ha sido reportado en alrededor de 60 países y en casi 900 especies de plantas. Posee un intervalo de hospederos amplio, Zentmyer (1985) reportó originalmente casi 1,000 hospederos aunque actualmente se conocen más de 3,000 especies hospederas (unas 2,000 de ellas tan sólo en Australia), todas ellas plantas leñosas, árboles o arbustos, cultivados, como ornamentales y silvestres (Coffey, 1984; Hardham, 2005).

La primera publicación sobre la pudrición de raicillas ocasionada por *P. cinnamomi* fue en Puerto Rico en 1927, pero fue hasta 1942 cuando se aisló de plantas de aguacate en California (USA). La pudrición de raicillas ocasionada por *P. cinnamomi* ha sido encontrada en casi todas las áreas en donde se cultiva esta especie frutal (Zentmyer *et al.*, 1994).

### 4.2.1. *Phytophthora cinnamomi* Rands (1922)

*Phytophthora* es un oomiceto que pertenece al Reino Stramenipila, Phylum Oomycota, Clase Oomycetes, Orden Peronosporales, Familia Pythiaceae, Género *Phytophthora* (Birch y Whisson, 2001; Hardham, 2005).

En el pasado, el género *Phytophthora* se consideraba como hongo, debido a su hábito de crecimiento filamentoso en estado vegetativo, y la formación de esporas para su reproducción asexual y sexual (Latijnhowers *et al.*, 2003). Adicionalmente, análisis bioquímicos conjuntamente con análisis filogenéticos de las secuencias genéticas de ARN ribosomal (rRNA) (Kumar y Rzhetsky, 1996; Paquin *et al.*, 1997), de aminoácidos de proteínas de las mitocondrias (Lang *et al.*, 1999) y de

genes cromosómicos que codifican para proteínas (Baldauf *et al.*, 2000), sugieren que los oomicetos tienen poca afinidad taxonómica con los hongos filamentosos.

Los oomicetos están estrechamente emparentados con las algas café (cromofitas), y con otros taxones que poseen pelos flagelares tubulares (mastigonemas), en un ensamble taxonómico conocido como Stramenipila (Barr, 1992; Patterson y Sogin, 1992).

#### 4.2.1.1. Phylum Oomycota

Las características, que lo distinguen del resto de los hongos son las siguientes: a) la mayoría produce zoosporas biflageladas con un flagelo brillante dirigido hacia adelante y un flagelo ondulante, dirigido hacia atrás, b) sus paredes celulares se componen principalmente de glucanos, pero también contienen celulosa entre otros géneros *Pythium*, *Phytophthora* y *Saprolegnia* no poseen quitina, c) su reproducción sexual es oógama por contacto de gametangios, d) la meiosis es gametangial, con un núcleo inicial somático y por lo tanto, diploide (Alexopoulos y Mims, 1979).

Los oomicetos son acuáticos que pueden vivir libremente o parasitando algas, mohos de agua, generalmente organismos animales pequeños y otras formas de vida acuática. Los más complejos de este *phyla* son parásitos terrestres de plantas que pasan su ciclo de vida completa en el hospedero y dependen del aire para la diseminación de sus esporas. Poseen un micelio alargado que carece de septos y está bien desarrollado, producen zoosporas en zoosporangios (esporas asexuales), y sus esporas latentes son las oosporas que se forman por la fusión de dos gametos morfológicamente distintos. Al producir zoosporas, todos ellos requieren o son favorecidos cuando hay una gran cantidad de agua o una película acuosa en el suelo o sobre la superficie de la planta (Alexopoulos y Mims, 1979).

Las estructuras somáticas de los organismos de este phylum van desde un simple talo unicelular a un micelio filamentoso, muy ramificado y abundante, que crece en el sustrato o en el medio circundante. Tienen una fase sexual y una asexual. En las formas complejas, que corresponden a parásitos especializados de plantas, existe la tendencia a producir varias generaciones asexuales durante la estación de crecimiento y sólo una generación sexual. La reproducción sexual en los oomicetos es heterogametángica. En las formas simples el talo entero actúa como gametangio. La formación de oosporas es característica de todas las especies simples. Las oosporas se originan en el oogonio y maduran dentro de éste. En la parte central del oogonio se diferencian uno o más oosporas, que son uninucleadas al madurar. Cuando son multinucleadas se les llama oosporas compuestas. Las zoosporas son producidas en toda esta clase exceptuando las especies más especializadas, en las cuales el esporangio por sí sólo asume la función de una espora y germina directamente por un tubo germinativo de donde se desarrolla el micelio. Estas zoosporas pueden ser piriformes o reniformes y cada una de ellas contiene un núcleo en forma de pera (Alexopoulos y Mims, 1979).

#### **4.2.1.2. Familia Pythiaceae**

La familia Pythiaceae, perteneciente al orden Peronosporales, incluye hongos acuáticos y terrestres, donde los últimos causan serias enfermedades a las plantas cultivadas. El micelio está bien desarrollado y algunas especies producen haustorios. Los esporangios producen y liberan una gran cantidad de zoosporas en su madurez. En las especies más especializadas los esporangios son caducos y germinan por un tubo germinativo en lugar de producir zoosporas. El tipo de germinación, por zoosporas o tubo germinativo, depende de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura. Las oosporas pueden ser formadas partenogénicamente o por fertilización (Alexopoulos y Mims, 1979).

#### 4.2.1.3. Género *Phytophthora*

Las especies de *Phytophthora* producen varias enfermedades en muchos tipos distintos de plantas. La mayoría generan pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tubérculos, cormos, tallos cortos y otros órganos, enfermedades muy semejantes a las ocasionadas por el género *Pythium* sp. Otras especies causan pudriciones de yema o de frutos y algunos tizones foliares. Algunas especies son específicas de un hospedero, pero otras tienen un amplio intervalo de hospedantes y pueden producir síntomas similares o distintos en muchos tipos de plantas (Agrios, 2005).

Para diferenciar al género *Phytophthora* del género *Pythium* se usa el método de germinación del esporangio. *Phytophthora* generalmente al germinar no forma una vesícula como ocurre en *Pythium* y si se formara, las zoosporas se diferencian dentro del esporangio y pasan a la vesícula como zoosporas maduras. El comportamiento de las distintas especies de *Phytophthora* que producen las pudriciones de la raíz de las plantas casi siempre es bastante semejante. El patógeno inverna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. En la primavera, las oosporas y las clamidosporas germinan en forma de zoosporas, mientras que el micelio prosigue su desarrollo y/o produce zoosporangios que liberan zoosporas. Estas últimas nadan en el agua del suelo en torno a las raíces y las infectan al entrar en contacto con ellas, si las plantas son susceptibles. El oomiceto forma abundante micelio y zoosporas en climas húmedos y moderadamente fríos y disemina la enfermedad a otras plantas. En climas secos, cálidos o incluso demasiado fríos, sobrevive en forma de oosporas, clamidosporas o micelio, que puede una vez más iniciar nuevas infecciones cuando el suelo se encuentra húmedo y la temperatura es favorable (Agrios, 2005).

Las características de las principales estructuras de *P. cinnamomi* son las siguientes:

**Micelio.**- No presenta septos y la principal característica que sirve para diferenciarla de otras especies de *Phytophthora*, la constituyen sus hifas con hinchamientos, que adquieren un aspecto de butiroso a coraliforme y son formadas más profusamente que en la mayoría de las otras especies de *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996).

**Esporangios:** Posee esporangios no papilados de forma ovoide, piriforme o elipsoidal a elongado-elipsoidal con un ápice compacto, no sobresaliente. Se estrechan o redondean hacia la base, son no caducos y nacen en el extremo terminal (Erwin y Ribeiro, 1996). Miden en promedio 75  $\mu\text{m}$  de largo y 40  $\mu\text{m}$  de ancho, aunque esto último es variable (Ho y Zentmyer, 1977). Posee también zoosporas móviles con una marcada habilidad para sintetizar una pared celular enquistada en pocos minutos (Bartnicki-García y Wang, 1983). Una diferenciación completa ocurre dentro del esporangio antes de que éstas sean liberadas a través de éste (Gisi, 1983). Estas unidades naturalmente infectivas proveen un gran potencial para causar enfermedad (Zentmyer, 1983).

**Clamidosporas.**- Son estructuras de supervivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados. Poseen un diámetro promedio de 41  $\mu\text{m}$  (Erwin y Ribeiro, 1996). Son globosas y de paredes delgadas (Zentmyer, 1980). Pueden ser terminales o intercalares en el micelio y a menudo aparecen como racimos de uvas de 3-10 clamidosporas (Erwin y Ribeiro, 1996). Estas estructuras son eventualmente liberadas en el suelo donde persisten por períodos prolongados. Germinan a través de varios tubos germinativos (Coffey, 1991).

**Órganos sexuales.**- Esta especie es heterotálica, las oosporas se forman cuando los tipos A1 y A2 se aparean. El tipo A2 está más ampliamente distribuido a nivel

mundial que el tipo A1. Las oosporas se pueden formar sin fertilización en cultivos del tipo A2 cuando es incubado en extractos de raíces, en tejidos de raíces de aguacateros enfermos o en granos de avena (Zentmyer *et al.*, 1979; Zentmyer, 1980; Zaki *et al.*, 1983). Los anteridios son anfíginos y promedian un tamaño de 17  $\mu\text{m}$ . Los oogonios son redondos y a menudo con una base estrechada, de pared lisa y hialina, cuyo diámetro promedia 40  $\mu\text{m}$  (Royle y Hickman, 1964). Durante la fertilización un tubo desde el anteridio penetra el oogonio (Ho y Zentmyer, 1977). Las oosporas son redondas, hialinas amarillas-cafés y su diámetro promedio depende del medio de cultivo, aunque va en un rango de 20-40  $\mu\text{m}$  (Ribeiro *et al.*, 1975).

#### **4.2.2. Ciclo de la enfermedad y epidemiología**

Las zoosporas cuando alcanzan la raíz del hospedero, se adhieren a las raicillas, formando una pared celular, se enquistan y germinan sobre ellas. El proceso de enquistamiento implica la pérdida de motilidad a través de la pérdida de los dos flagelos y la secreción de material adhesivo el cual pega a las zoosporas a la superficie de la raíz y después de unos 5 minutos, la formación de una pared celular celulósica (Hardham, 1998).

La germinación de los quistes ocurre en unos 20 a 30 minutos después del enquistamiento. Los tubos germinativos pueden crecer por una hora aproximadamente, en ausencia de nutrientes exógenos. En la cercanía de una raíz crecen quimiotrópicamente hacia la misma, penetrando la superficie entre las células epidérmicas. La penetración ocurre dentro de 24 horas después de la infección (Zentmyer, 1961). Unas 6 horas después de la penetración, el tejido de la raíz alimentadora se muere (Coffey, 1984), y el oomiceto crece dentro de ese tejido necrótico por algunos días. Cuando las reservas alimenticias del tejido de la raíz se agotan, el patógeno es estimulado a esporular. Se forman dos tipos de esporas: esporangios y clamidosporas. En la Figura 1 se muestra el ciclo de la

enfermedad, pudrición de raíz causada por *P. cinnamomi*. Dos a tres días después del inicio de la infección, el patógeno puede esporular otra vez, formando esporangios sobre la superficie de la raíz y liberando más zoosporas en el medio que rodea la raíz. De esta manera el inóculo se multiplica rápidamente (Hardham, 1998).

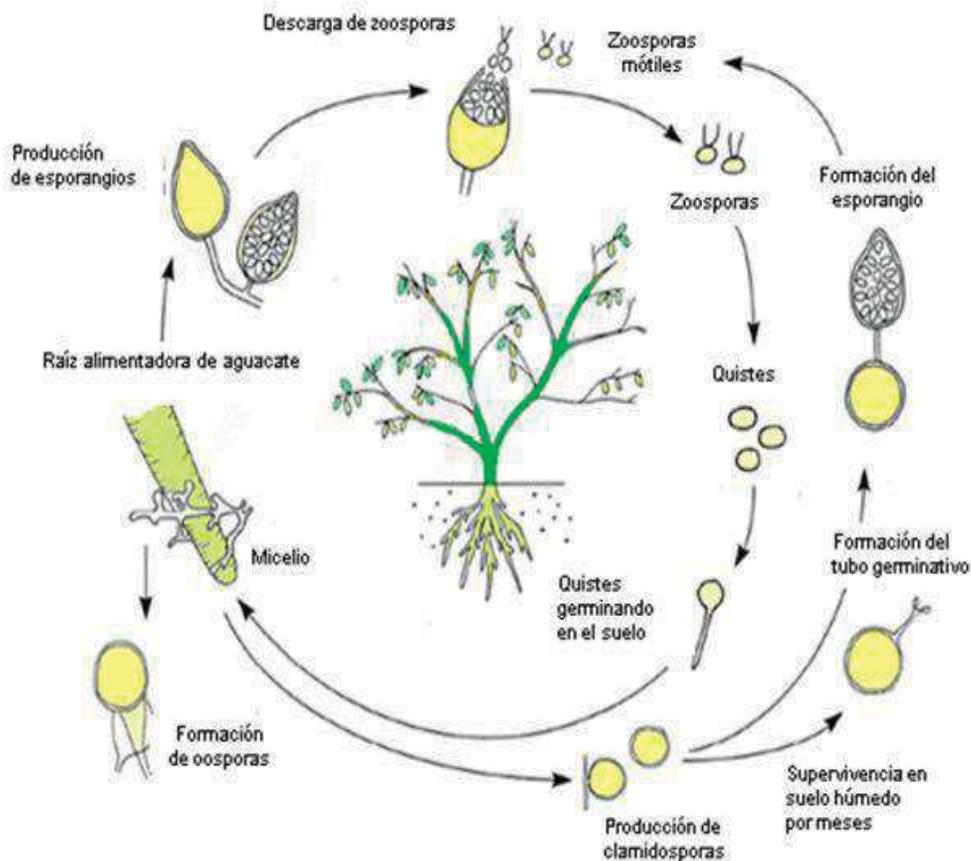


Figura 1. Ciclo de la enfermedad de pudrición de la raíz de aguacate, causada por *Phytophthora cinnamomi*. Adaptado de Pegg *et al.*, 2002.

Esta especie de *Phytophthora* tiene mayor capacidad para sobrevivir como saprófito que otras especies y puede permanecer seis años en suelos naturalmente infestados almacenados a 20°C y con 20% de humedad. En suelos cultivados con aguacateros, el patógeno puede ser recuperado al cabo de un periodo de diez años. El patógeno puede sobrevivir en suelos húmedos por muchos años, ya sea en raíces alimenticias muertas (las que son muy persistentes en el suelo), como micelio inactivo, clamidosporas u oosporas. Las oosporas se forman en presencia de raíces del aguacatero pero no se encuentran en tejidos naturalmente infectados. El agua libre no es esencial para la producción de clamidosporas y oosporas de *P. cinnamomi*, aunque estas esporas pueden ser producidas en medio líquido (Zentmyer y Mircetich, 1966; Ribeiro *et al.*, 1976).

*P. cinnamomi* se desarrolla mejor en áreas de climas templados benignos o subtropicales, no se desarrolla o bien su supervivencia se ve afectada con temperaturas del suelo por debajo de 5-6°C, o altas temperaturas por arriba de 34-36°C. Las temperaturas óptimas están en el rango de 21-27°C. Las temperaturas fuera del rango óptimo, probablemente sean inhibitorias a la producción de zoosporas y esporangios. Bajo condiciones de baja humedad del suelo, el patógeno no sobrevive o no se disemina con rapidez. Los períodos de abundante humedad en el suelo, promueven la producción de esporangios, liberación de zoosporas e invasión de raíces hospederas. Sin embargo, en un suelo continuamente saturado de agua, con bajas concentraciones de oxígeno el desarrollo se detiene. La enfermedad se produce con mayor rapidez bajo condiciones de suelo con pH de ligeramente ácido a neutro (Zentmyer, 1985).

Los síntomas incluyen una muerte progresiva de las ramas de los árboles, marchitez y amarillamiento de las hojas y finalmente una defoliación completa. Con frecuencia, cuando aparecen esos síntomas en la parte aérea de la planta, es porque muchas de las raíces alimentadoras ya han sido destruidas. Las hojas de los árboles infectados son pequeñas, verde pálido, a menudo marchitas, y

frecuentemente tienen sus puntas color café. El follaje es escaso, hay ausencia de brotes nuevos, pero si se presentan, las nuevas hojas son pequeñas, y decoloradas. Las pequeñas ramas en la parte superior del árbol sufren una muerte regresiva, provocando que otras ramas queden descubiertas y sufran quemaduras de sol. Los árboles enfermos frecuentemente producen una abundante cosecha de frutos muy pequeños (Faber y Marais, 2001).

En aguacate, las zoosporas de *P. cinnamomi* son atraídas a las raíces por los exudados de éstas, que están constituidos principalmente por los aminoácidos asparagina y glutamina. Las zoosporas son atraídas específicamente a heridas, si las hay, o bien justo detrás de la cofia de la raíz (Pegg *et al.*, 2002). Cuando las zoosporas entran en contacto con la raíz, pierden sus flagelos y forman pequeños quistes esféricos. Los quistes germinan para formar la hifa de infección, que invade la corteza de la raíz intracelularmente. A su vez, el aguacate reconoce a *P. cinnamomi* por la liberación de éste de inductores conocidos como  $\alpha$ -cinnamomina y  $\beta$ -cinnamomina (Pernollet *et al.*, 1993; Kamoun *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1999). Generalmente estos inductores provocan respuestas de defensa de la planta, que se manifiestan por la respuesta hipersensible (Nimchuk *et al.*, 2003).

**4.3. LA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA COMO UNA ALTERNATIVA PARA LA SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE CON TOLERANCIA A *Phytophthora cinnamomi*.** Marco Antonio Cortés Rodríguez, Alejandra Hernández García, Rodolfo López Gómez y Rafael Salgado Garciglia. 2010. Revista Biológicas (Fac. de Biología, UMSNH), 12(2):143-150.

# La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*

Marco Antonio Cortés Rodríguez, Alejandra Hernández García, Rodolfo López Gómez y Rafael Salgado Garciglia

Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B1, Ciudad Universitaria, CP 58060, Morelia, Michoacán, México

## Resumen

Uno de los problemas fitosanitarios más graves a nivel mundial para el aguacate (*Persea americana* Mill.) es la enfermedad que provoca pudriciones en la raíz de portainjertos de aguacate, cuyo agente causal es el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands, esta enfermedad ha sido un factor limitante en la producción. Las prácticas complementarias de manejo incluyen la prevención, el control químico y biológico y el uso de portainjertos tolerantes. Algunos portainjertos de aguacate han mostrado moderada y alta tolerancia al oomiceto, inhibiendo el progreso de la infección en la raíz. Por ello, una alternativa potencial es la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *P. cinnamomi*. Con los avances de la biología molecular, la búsqueda de genes de resistencia es una alternativa viable, ya que se ha demostrado en algunas plantas el papel de ciertos genes que codifican para proteínas relacionadas a patogénesis (PR) y genes de resistencia (genes R), estos genes controlan el ataque de oomicetos, nemátodos, virus, bacterias y hongos. En esta revisión se describe la existencia de genes de resistencia para el control de fitopatógenos y el potencial de identificarlos en portainjertos de aguacate criollo mexicano tolerantes a *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** Aguacate criollo mexicano, genes de resistencia, *Phytophthora cinnamomi*.

## Abstract

One of the major phytosanitary problems worldwide of avocado (*Persea americana* Mill.) is the root rot disease of the avocado rootstocks whose causal agent is the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands, this disease has been a limiting factor in the production. Complementary management practices include prevention, chemical and biological control and the use of avocado tolerant rootstocks. Some avocado rootstocks have shown moderate and high tolerance to the oomycete, inhibiting the progress of infection in the root. Therefore, a potential alternative is the selection of avocado rootstocks tolerant to *P. cinnamomi*. With advances in molecular biology, the search for genes of resistance is a viable alternative, because it has been shown in some plants the role of certain genes that encode for pathogenesis-related proteins (PR) and resistance genes (R genes), these genes control the attack of oomycete, nematodes, viruses, bacteria and fungi. This review describes the existence of genes for resistance to *Phytophthora* control and the potential to identify genes of resistance in avocado Mexican race rootstocks tolerant to *P. cinnamomi*.

**Keywords:** Avocado Mexican race, resistance genes, *Phytophthora cinnamomi*.

## Introducción

La importancia socioeconómica del aguacate (*Persea americana* Miller) se deriva del beneficio que derrama entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores. Los huertos de aguacate generan empleo al demandar mano de obra para realizar podas, riego, fertilización, cuidado fitosanitario, la colecta, la selección, el empaque y la comercialización. México tiene el primer lugar tanto de productor como exportador mundial de aguacate Hass (*P. americana* Mill. cv. Hass) y (SAGARPA 2007; Téliz y Marroquín, 2007).

Sin embargo, un inconveniente en la producción del aguacate son las enfermedades de raíz, siendo la más importante y devastadora la pudrición radical, conocida como "tristeza del aguacatero" (Zentmyer, 1985). Esta enfermedad causada por

el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands, reduce la biomasa de la raíz y afecta su función debido al daño que causa en las raíces absorbentes. Los síntomas de esta enfermedad son clorosis, marchitez y defoliación, que se presentan en cualquier etapa del ciclo biológico de la planta, sin embargo, las plantas juveniles son más susceptibles (Zentmyer, 1985). En el estado de Michoacán la pudrición radical o tristeza del aguacatero causada por *P. cinnamomi* ocasionó daños severos a por lo menos 100,000 árboles de aguacatero, causando pérdidas económicas para los productores por más de 32 millones de pesos (Vidales y Alcantar, 1999).

En nuestro país y concretamente en la región aguacatera de Michoacán, el éxito en la productividad del aguacate Hass se le debe en gran medida al portainjerto utilizado, ya que éste le

Autor de correspondencia: Rafael Salgado Garciglia, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, 2o. Piso, Ciudad Universitaria, CP 58060, Morelia, Mich., México. Tel. 3265790 Ext. 116, Tel-Fax 3265788. Email: rsalgado@umich.mx

confiere mejor calidad agronómica por optimizar la absorción de agua y nutrimentos, y otorgar cierta tolerancia a patógenos del suelo. Estos portainjertos son aguacates de la raza Mexicana cuyo nombre común es aguacate criollo Mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) (Gallegos, 1983).

Una prioridad en la investigación mundial sobre aguacate es encontrar portainjertos tolerantes a *P. cinnamomi*, ya que el control de esta enfermedad es de interés común en toda la industria aguacatera (Gallo-Llobet *et al.*, 1999). Se han seleccionado genotipos de aguacate con tolerancia moderada a *P. cinnamomi*; como el cultivar Duke-6, Duke-7 y G6; y de alta tolerancia, como los cultivares D9, Toro Canyon, Thomas y Martin Grande (G755), todos ellos híbridos de aguacates criollos (Zentmyer, 1992). Actualmente en México, en las plantaciones de aguacate solo se utiliza como portainjerto la variedad Mexicana, debido a que los híbridos considerados como moderados o altamente tolerantes a *P. cinnamomi* no se adaptan a suelo y condiciones climáticas de la región aguacatera de nuestro país, lo cual repercute en la disminución de la productividad del cultivar Hass (Newett *et al.*, 2002).

Con los avances de la biología molecular es posible determinar la resistencia genética de una planta a las diversas plagas y enfermedades, con ello se han identificado los principales genes involucrados como respuesta de defensa en la interacción planta-patógeno. Estos genes de defensa pueden ser de dos tipos, los denominados genes *PR* que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (*PR*) y los genes *R*, genes de resistencia que dirigen la expresión de proteínas *R* que detectan patógenos y desencadenan respuesta de defensa. El control de enfermedades en plantas con el uso de genes de resistencia (genes *PR* y genes *R*) ha sido un éxito, ya que en muchos casos un solo gene de resistencia puede proveer una completa resistencia a una o más cepas de un patógeno en particular. Por esta razón, tanto los genes *PR* como los genes *R* son utilizados en programas de mejoramiento convencional para generar resistencia o tolerancia (Pink, 2002).

## Respuestas de defensa en plantas

Tras el reconocimiento del patógeno se desencadenan las respuestas de defensa con rápido flujo de iones, el estallido oxidativo extracelular, la reprogramación transcripcional dentro y alrededor de los sitios de infección y en la mayoría de los casos la respuesta hipersensible (Nimchuk *et al.*, 2003). Se considera que la suma de esos eventos conduce a la detención del crecimiento del patógeno (Belkhadir *et al.*, 2004). En ausencia de un reconocimiento específico del patógeno, también ocurre una respuesta de defensa basal, la cual aparentemente es manejada por los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), tales como flagelina y lipopolisacáridos (Gómez-Gómez y Boller, 2002). En plantas, los PAMPs son más conocidos como inductores generales (no específicos). La defensa basal no evita la colonización por el patógeno, pero limita la extensión de su difusión (Glazebrook, 1997).

Durante la infección se pueden activar los genes de resistencia (genes *R*) que pueden funcionar para impedir el desarrollo del patógeno. Sin embargo, cuando un patógeno avirulento infecta una planta, con frecuencia provoca una muerte rápida

de células y la síntesis de compuestos antimicrobianos en el sitio de infección, que restringe el crecimiento del patógeno y lo torna avirulento (Dong, 1995). Como resultado ocurre una necrosis visible llamada respuesta hipersensible (Lamb *et al.*, 1989; Dixon y Lamb, 1990), que implica la expresión localizada de proteínas relacionadas a patogénesis (*PR*) y causa una muerte celular programada en el hospedero. En esta etapa del proceso de infección, ocurre la deposición de calosa en el sitio de infección (Vogel *et al.*, 2002), además de glóbulos extracelulares conteniendo compuestos fenólicos, los cuales se depositan cerca de las células que muestran la respuesta hipersensible y pueden funcionar en el reforzamiento de la pared celular (Vleeshouwer *et al.*, 2000). Con la respuesta hipersensible se forma una zona de células muertas alrededor del sitio de infección, ocurre síntesis de ácido salicílico y una acumulación de agentes antimicrobianos, como las proteínas *PR* (quitinasas y glucanasas) y fitoalexinas (Hammond-Kosack y Jones, 1996), también se da un desbalance del  $Ca^{2+}$  citosólico en el disparo de los mecanismos de defensa y en la mediación del establecimiento de la inmunidad sistémica (Delledone *et al.*, 2001) (**Figura 1**).

La aparición de una respuesta hipersensible no solamente restringe el crecimiento del patógeno sino también precede, y puede ser la causa directa de la activación de un proceso de señalización, que conduce a la expresión sistémica de una colección de genes *PR* y una resistencia no específica, reforzada y duradera contra un amplio rango de patógenos, conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Kuc, 1982; Ryals *et al.*, 1994). Por lo tanto, una planta expuesta a un patógeno avirulento puede ser “inmunizada” contra una variedad de patógenos virulentos. A partir de los resultados de Flor (1971) quien estudió la genética de la interacción entre la planta de lino y el patógeno *Melampsora lini*, se obtuvo una sustancial comprensión sobre las interacciones genéticas que controlan la resistencia de las plantas a las enfermedades, ya que se estudió concurrentemente la herencia de la resistencia en el hospedero y de la virulencia en el patógeno. Como resultado de estas investigaciones, se formuló la hipótesis de gene-por-gene, en su forma más simple, esta hipótesis establece que las plantas contienen genes de resistencia (*R*) sencillos, normalmente dominantes, que reconocen específicamente patógenos que contienen genes complementarios de avirulencia (*avr*). Estos pueden ser definidos como genes del patógeno que codifican para una proteína que es condicionalmente reconocida directa o indirectamente sólo por aquellas plantas que contienen el gene *R* complementario. El reconocimiento específico resulta en la inducción de la expresión de genes de defensa y la inhibición del crecimiento del patógeno (**Figura 1**) (Staskawicz, 2001).

## Genes *R*

Los genes *R* en plantas codifican para receptores o componentes de receptores, localizados en la membrana celular o en el citoplasma. Estos genes *R* se clasifican en cinco grupos o familias en base al tipo de dominio que presentan (Bent, 1996; Sanseverino *et al.*, 2009). La mayoría de las proteínas *R* contienen un sitio de unión a nucleótido (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR), de este tipo hay dos clases, TIR-NBS-LRR y CC-NBS-LRR; otro grupo se caracteriza por tener un dominio serín-treonín cinasa con un dominio extracelular LRR; el cuarto grupo son proteínas

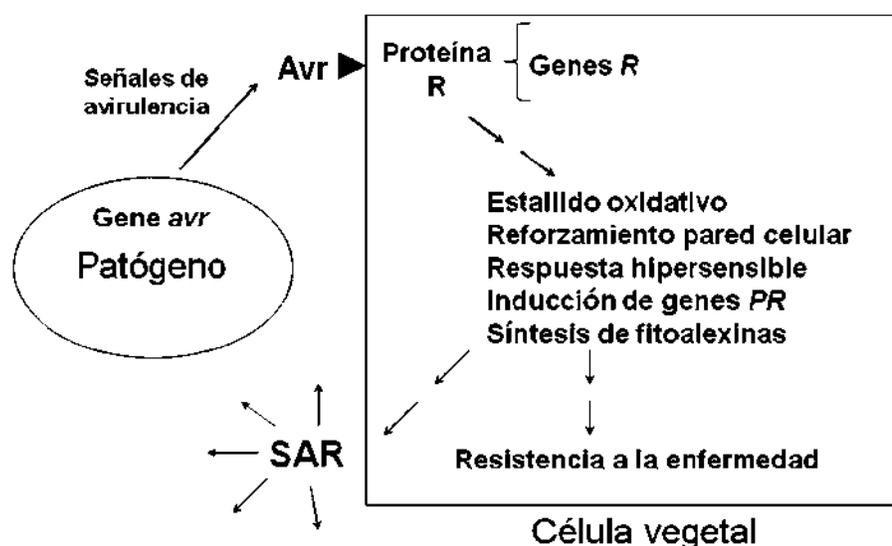


Figura 1. Esquema del modelo gene-por-gene en el mecanismo de defensa de las plantas (Flor, 1971)

cinasa unida con el receptor LRR; y los restantes son genes *R* que involucran mecanismos diferentes a los anteriormente citados (Afzal *et al.*, 2008; De Hoff *et al.*, 2009) (Figura 2). Se han identificado más de 90 genes *R* en diversas plantas, utilizando diferentes métodos moleculares (Ingvarsdén *et al.*, 2008), lo cual ofrece amplias oportunidades para aislar secuencias similares en diversas especies vegetales (Yan *et al.*, 2003).

Los genes *R* conforman la base de la resistencia vertical o monogénica u oligogénica. Los genes de resistencia se han utilizado en los programas de fitomejoramiento, porque su incorporación en un cultivar dado, es fenotípicamente detectable pues es determinante para la manifestación de la resistencia. A pesar de lo que sugiere su nombre, los genes *R* no son directamente responsables de la resistencia, sino que actúan como receptores de las señales (proteínas Avr) originadas del patógeno. Esto conlleva a la activación de diferentes cascadas de señales que en última instancia inician la expresión de genes responsables de los mecanismos de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

En la tabla 1 se enlistan ejemplos de genes *R* identificados en plantas de interés agrícola (arroz, soya, maíz, trigo, fresa, papa y jitomate, entre otras), para el control de diversos patógenos (nematodos, virus, bacterias, hongos y oomicetos).

## Genes PR

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) son un grupo de diversas proteínas que se producen en plantas en respuesta al ataque de un patógeno y que generalmente son inducidas en situaciones patológicas (van Loon *et al.*, 1994). Las PR se acumulan después del ataque de un patógeno (virus, viroides, bacterias, hongos, oomicetos, insectos y herbívoros) y son activados por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Sels *et al.*, 2008). Estas proteínas se han detectado e identificado en una amplia variedad de plantas y se clasifican de acuerdo a su actividad. A la fecha se conocen 17 grupos diferentes (Tabla 2).

Las proteínas PR2 son glucanasas, cuya actividad es degradar el principal componente de la pared celular de hongos, aunque contribuye a la resistencia por liberar fragmentos glicosídicos de la pared celular de la planta o del patógeno, que actúan como inductores de la respuesta de defensa. Varias familias de proteínas PR presentan actividad quitinasa (PR3, PR8 y PR11) que actúan en respuesta de defensa en forma sinérgica con las glucanasas. Las PR7 son endoproteinasas y las PR10 son ribonucleasas (van Loon *et al.*, 2006).

Las enzimas indispensables para la biosíntesis de metabolitos de bajo peso molecular (fitoalexinas), como chalcona sintasa

Planta	Gene R	Patógeno	Referencia
Jitomate	Cf9	Cladosporium fulvum	van Kan <i>et al.</i> , 1991
Soya	Rgh1	Heterodera glycines	Riggs y Wrather, 1992
Cebada	Rpg1	Puccinia graminis	Kilian <i>et al.</i> , 1994
Arroz	Xa21	Xanthomonas oryzae	Wang <i>et al.</i> , 1996
Cebada	Mlo	Erysiphe graminis	Buschges <i>et al.</i> , 1997
Jitomate	Pto	Pseudomonas syringae	Tang <i>et al.</i> , 1999
Soya	LM6	Phytophthora sojae	Graham <i>et al.</i> , 2002
Fresa	FXa	Botrytis cinerea	Arranz <i>et al.</i> , 2003
Maíz	RP1-D	Virus del mosaico del maíz	Shavannor <i>et al.</i> , 2010

Tabla 1. Ejemplos de genes *R* contra diversos tipos de patógenos (nematodos, virus, bacterias, hongos y oomicetos) en diferentes cultivos.

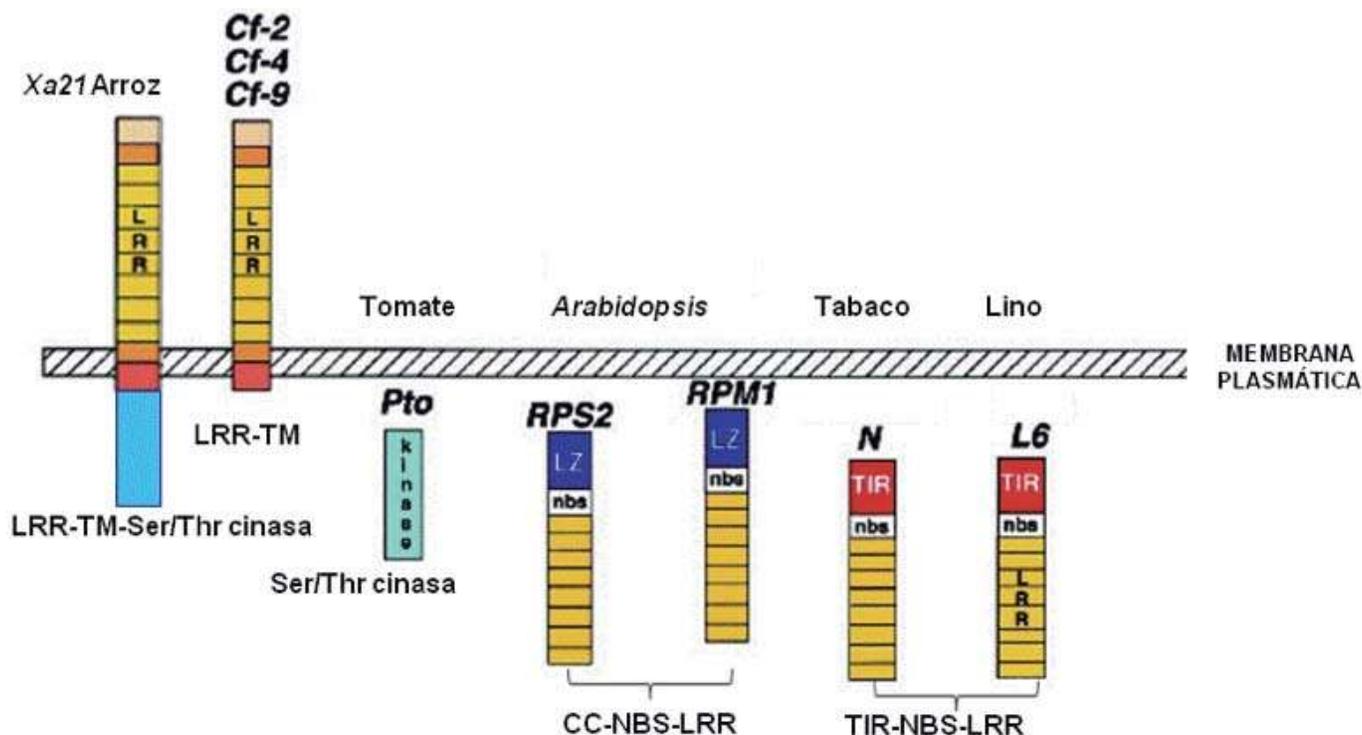


Figura 2. Diferentes clases de genes R (De Wit, 1997).

Familia	Miembro tipo	Propiedades
PR-1	PR-1a Tabaco	14-17kD
PR-2	PR-2 Tabaco	Clase I, II y III endo-beta-1,3-glucanasas, 25-35kD
PR-3	P, Q Tabaco	Clase I, II, IV, V, VI y VII endoquitinasas, 30kD
PR-4	R Tabaco	Actividad endoquitinasa, antifúngica, 13-19kD
PR-5	S Tabaco	Proteína tipo taumatina, osmotina, zeamatina, permeatina, similar a inhibidores alfa-amilasa/tripsina, antifúngica
PR-6	Inhibidor I Jitomate	Inhibidores de proteasas, 6-13kD
PR-7	P69 Jitomate	Endoproteasas
PR-8	Quitinasa Pepino	Clase III quitinasas, quitinasa/lisosima
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina	Peroxidasas, proteínas tipo peroxidasas
PR-10	PR-1 Perejil	Ribonucleasas, Proteínas-Bet v 1-relacionadas
PR-11	Clase V Quitinasa Tabaco	Endoquitinasa
PR-12	Ps-AFP3 Rábano	Defensinas
PR-13	THI2.1 <i>Arabidopsis</i>	Tioninas
PR-14	LTP4 Cebada	Proteínas transportadoras de lípidos no-específicas (ns-LTPs)
PR-15	OxOa Cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP Cebada	Proteínas tipo oxalato-oxidasa
PR-17	PRp27 Tabaco	Se desconoce

Tabla 2. Clasificación de proteínas PR en diferentes plantas (Van Loon et al., 2006).

(CHS), flavanona-3-hidroxilasa (F3H) y fenilalanil-amonioliasa (PAL), pueden ser consideradas como proteínas relacionadas con mecanismo de defensa. Otras proteínas de defensa son las enzimas del estrés oxidativo, de reparación de tejidos, lignificación y otros procesos relacionados. Estos genes, llamados genes de defensa, conforman la base de la resistencia horizontal o poligénica conocida por los fitopatólogos y mejoradores de plantas. Los mecanismos de defensa de la resistencia horizontal, sean estos, la producción de fitoalexinas, proteínas PR, deposición de lignina, reacción hipersensible o SAR; son los responsables de actuar en detrimento del patógeno invasor. En otras palabras, la defensa en plantas es básicamente poligénica (van Loon *et al.*, 2006).

## Aislamiento e identificación de genes de resistencia

La hibridación sustractiva, el escrutinio diferencial, la obtención de secuencias de expresión al azar (EST), mapeo de genes y microarreglos, son ampliamente utilizados para aislar diferencialmente genes expresados en plantas. Secuencias específicas de ADN genómico amplificadas por iniciadores degenerados basados en esos motivos son conocidas como genes análogos de resistencia (RGAs). El enfoque RGA ha sido usado para aislar genes de resistencia de las plantas y desarrollar marcadores moleculares. Leister y colaboradores (1996) obtuvieron productos de PCR en papa que eran homólogos a conocidos genes de resistencia, y ligados al locus de resistencia a nemátodos (*Gro1*) y al locus de resistencia al tizón tardío (*R7*). Similarmente, Kanazin y col. (1996) mapearon varios loci RGA que eran cercanos a conocidos genes de resistencia en soya. Yu y col. (1996), mapearon RGAs de genes para resistencia a potivirus (*Rsv1* y *Rpv*), pudrición de la raíz por *Phytophthora* (*Rps1*, *Rps2*, y *Rps3*) y por *Peronospora parasitica* (*Rmd*) en soya. Feuillet y col. (1997), aislaron un gene candidato *LrK10* para resistencia a la roya de la hoja en trigo. Muchos de esos RGAs están estrechamente ligados o cosegregan con loci de resistencia a enfermedades conocidas (Yu *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 2000). Varios RGAs han facilitado la clonación de la longitud total de

genes *R* funcionales, incluyendo el gene *Dm3* de lechuga que confiere resistencia a 'mildiú veloso' (*Bremia lactucae*; Meyers *et al.*, 1998) y el gene *Rpp8* de *Arabidopsis*, que es responsable de la resistencia a *Peronospora parasitica* (Aarts *et al.*, 1998). Por lo tanto, los RGAs proveen valiosos recursos de secuencias para utilizar el enfoque de genes candidato para clonar genes *R* (Pflieger *et al.*, 2001).

Chen y col. (1998a), mejoraron el enfoque RGA usando electroforesis de alta resolución y detección sensible para separar los productos de PCR amplificados con iniciadores basados en secuencias conservadas de genes de resistencia ya clonados. Posteriormente, la técnica fue denominada como polimorfismo de genes análogos de resistencia (RGAP) (Chen *et al.*, 1998b). La técnica RGAP ha sido exitosamente usada para desarrollar marcadores moleculares para genes que confieren resistencia a la roya lineal de la hoja y otras enfermedades del trigo y cebada (Chen *et al.*, 1998b).

## Genes de resistencia contra *Phytophthora*

Los mecanismos de resistencia al ataque de *Phytophthora* se dividen en dos: aquellos que le confieren resistencia general, que es la resistencia de una planta hacia todas las razas de un patógeno, por ejemplo, las reacciones de hipersensibilidad, la inducción de barreras estructurales y la producción de fitoalexinas, donde se ven implicados la inducción de genes *PR*; y aquellos que confieren resistencia específica, en la cual interactúan los genes *avr* del patógeno y los genes *R* de la planta hospedera, la cual es efectiva dentro de un hospedero a ciertas razas de *Phytophthora* y que usualmente es controlada por genes individuales de resistencia en el hospedero (Erwin *et al.*, 1983).

Existe abundante literatura publicada que demuestra que en los últimos años son considerables los trabajos realizados en la búsqueda de resistencia a varias especies de *Phytophthora*, por ejemplo el mejoramiento del tomate para lograr la resistencia a *P. infestans*, en el cultivo de la fresa contra *P. fragariae*, y en soya con resistencia a *P. sojae*, entre otras (Tabla 3). Recientemente en soya se ha clonado el gene *R* (*Rps1k*) que confiere resistencia a *P.*

Planta	Gene	Clase	Especie de <i>Phytophthora</i>	Referencia
Jitomate	PR5	Tipo taumatina	<i>P. citrophthora</i>	Rodrigo <i>et al.</i> , 1991
Papa	R6 R7	TIR-NBS-LRR	<i>P. infestans</i>	El-Kharbotly <i>et al.</i> , 1996
Pimiento	Phyt3 Phyt1	TIR-NBS-LRR	<i>P. infestans</i> <i>P. capsici</i>	Lefebvre y Palloix, 1996
Fresa	Rpf2	TIR-NBS-LRR	<i>P. fragariae</i>	Van de Weg, 1996
Papa	Cyp	Cisteín proteasa	<i>P. infestans</i>	Avrova <i>et al.</i> , 1999
Soya	LM6	TIR-NBS-LRR	<i>P. sojae</i>	Graham <i>et al.</i> , 2002
Colza	RPS2	TIR-NBS-LRR	<i>P. capsici</i>	Tanhuanpaa, 2004
Soya	Rps1k	CC-NBS-LRR	<i>P. sojae</i>	Gao y Bhattacharyya, 2008
Papa	Tm2	TIR-NBS-LRR	<i>P. infestans</i>	Pel <i>et al.</i> , 2009

*sojae*, que causa la pudrición de raíces y tallos, clasificado dentro del grupo de genes CC-NBS-LRR (Gao y Bhattacharyya, 2008).

También genes *PR* se han reportado como responsables de la defensa contra *Phytophthora* spp, las proteínas PR-1 y PR-5 muestran actividad específica directa en contra de oomicetos. El mecanismo de acción de PR-1 aún no es muy claro, sin embargo, para los miembros de PR-5 se han descrito diversos mecanismos de acción, como permeabilizadores de membrana, unión e hidrólisis de glucanos y apoptosis. Cierta actividad antioomiceto también se ha demostrado por los miembros de la familia de proteínas PR-2, debido a su actividad hidrolítica; las beta-1,3-glucanasas pueden hidrolizar glucanos presentes en la pared celular de oomicetos (van Loon *et al.*, 2006).

En papa se expresan constitutivamente los genes *PR1*, *PR2* y *PR5*, que contribuyen a una resistencia no específica contra *P. infestans* (Vleeshouwers *et al.*, 2000). Kamoun (2001) reporta este tipo de resistencia en tabaco, perejil y jitomate. La proteína PR-5 de tabaco constitutivamente expresada en plantas transgénicas de *Citrus sinensis* (naranja) confiere resistencia a *P. citrophthora*, indicativo de la actividad antioomiceto de estas proteínas (Fagoaga *et al.*, 2001).

## Genes de resistencia en aguacate

Los estudios de secuencias nucleotídicas en aguacate, reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), indican principalmente genes relacionados con el metabolismo primario y con procesos de división celular y fisiológicos (desarrollo vegetal). Otros se refieren a genes involucrados en el metabolismo secundario, que codifican para enzimas como la fenilalanil-amonio-liasa (PAL), flavanona-3-hidroxilasa (F3H) y chalcona sintasa (CHS), que juegan un papel importante en la defensa de las plantas.

Sin embargo, solo hay tres reportes de genes de aguacate descritos en el NCBI, involucrados directamente con resistencia. El gene *PR3* (endoquitinasa de 32 KDa) (Sowka *et al.*, 1998), el gene *R* que expresa la proteína Serín-treonín-cinasa (STK) (Di Gaspero y Cipriani 2003; Chen *et al.*, 2008), el gene *PR5* que codifica para una proteína relacionada a taumatina (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2009). Genes relacionados con la defensa en aguacate hacia *P. cinnamomi* aún no se han reportado.

En nuestro grupo de trabajo, actualmente se realiza la búsqueda de genes de resistencia en portainjertos de aguacate criollo mexicano para el control de *P. cinnamomi*. Se cuenta con dos genotipos tolerantes a este oomiceto (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2010) con los cuales se están realizando ensayos de interacción aguacate-*Phytophthora* para identificar genes relacionados con la resistencia. En un primer intento, se buscará observar la expresión del gene *PR5* en dichos genotipos de aguacate desafiados al ataque de *P. cinnamomi*. Mediante métodos moleculares también se amplificarán otros genes *R* involucrados en la resistencia a *Phytophthora* spp, como el *LM6* y *Cyp*, descritos para la resistencia a *P. sojae* en soya y a *P. infestans* en papa, respectivamente.

## Conclusiones

La búsqueda de genes de resistencia en portainjertos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) para el control de *P. cinnamomi*, es una realidad con el análisis de genotipos

tolerantes a este patógeno. La identificación molecular de genes de resistencia a *P. cinnamomi* permitirá desarrollar programas de mejoramiento genético que beneficien directamente los rendimientos del cultivo del aguacate comercial (cv. Hass).

## Referencias

- Aarts, M.G., B.L. Hekkert, E.B. Holub, J.L. Beynon, W.J. Stiekema y A. Pereira** (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:251-258.
- Arranz, M., A.P. Eslava, I.M. Diaz-Minguez y E.P. Benito** (2003). *Hypervirulent strains of Botrytis cinerea show altered respiration. XII Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA.* p. 385.
- Avrova, A.O., H.E. Stewart, W. De Jong, J. Heilbronn, G.D. Lyon y P.R.J. Birch** (1999). A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:1114-1119.
- Afzal, A. J., A.J. Wood y D.A. Lightfoot** (2008). *Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense.* *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:507-517.
- Belkhadir, Y., R. Subramaniam y J. L. Dangl** (2004). *Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners.* *Current Opinion Plant Biology* 7:391-399.
- Bent, A. F.** (1996). *Plant disease resistance genes: function meets structure.* *Plant Cell* 8:1757-1771.
- Buschges, R., K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. van Daelan, T. van der Lee, P. Diergaarde y J. Groenendijk** (1997). The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88:695-705.
- Chen, X. M., R. Line y H. Leung** (1998a). *Genome scanning for disease resistance gene analogs in wheat, barley and rice by high-resolution electrophoresis.* *Theoretical and Applied Genetics* 97:345-355.
- Chen, X.M., P.M. Hayes, T. Toojinda, H. Vivar, D. Kudrna, A. Kleinhofs, H. Leung y R.F. Line** (1998b). Genetic mapping of genes for stripe rust resistance in barley using resistance gene analog polymorphism and AFLP markers. *Phytopathology* 88:S16.
- Chen, H., Morrell P.L., De La Cruz M. y Clegg M.T.** (2008). *Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (Persea americana Mill.).* *Journal of Heredity* 99(4):382-389.
- Cortés-Rodríguez, M.A., J. Campos-García, R. Lopez-Gomez y R. Salgado-Garciglia** (2009). *Persea americana* var. *drymifolia* PR-5 gene, partial cds. GenBank: FJ840440.1
- Cortés-Rodríguez, M.A., I.Y. Acosta-Rivera, A. Hernández-García, R. López-Gómez, J.L. Sánchez-Pérez, A.T. Chávez-Bárceñas, S.P. Pavía-Fernández y R. Salgado-Garciglia** (2010). Evaluation of tolerance to *Phytophthora cinnamomi* in micropropagated plants of avocado Mexican race (*Persea americana* var. *drymifolia* 'Schltdl. & Cham.' S.F. Blake). *Revista Mexicana de Fitopatología* (En prensa).
- De Hoff, P. L., M.B. Lawrence y A.M. Hirsch** (2009). *Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense.* *Molecular Genetic Genomics* 282:1-15.
- De Wit, P.J.G.M.** (1997). *Molecular characterization of gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens.* *Annual Review of Phytopathology* 30:391-402.
- Delledone, M., J. Zeier, A. Marocco y C. Lamb** (2001). *Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant*

- hypersensitive disease resistance response. Proceeding of National Academy of Science, USA.* 98:13454-13459.
- Deng, Z.**, S. Huang, P. Ling, C. Chen, C. Yu, C.A. Weber, G.A. Moore y F.G. Gmitter Jr. (2000). Cloning and characterization of NBSLR class resistance gene-candidate sequences in citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 101:814-822.
- Di Gaspero, G.** y G. Cipriani (2003). *Nucleotide binding sit/leucine-rich repeats*, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Molecular Genetic Genomics* 269:612-623.
- Dixon, R.A.** y C.J. Lamb (1990). *Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annual Review Physiology and Plant Molecular Biology* 41:339-367.
- Dong, X.** (1995). Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance. *Proceeding of National Academy of Science, USA.* 92:7137-7139.
- El-Kharbotly, A.**, C. Palomino-Sánchez, F. Salamini, E. Jacobsen y C. Gebhardt (1996). R6 and R7 alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the R3 locus on chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics* 92:880-884.
- Erwin, D.C.**, S. Bartnicki-García y P.H. Tsao (1983). *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 392 p.
- Fagoaga, C.**, I. Rodrigo y V. Conejero (2001). Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7:175-85.
- Feuillet, C.**, G. Schachermayr y B. Keller (1997). *Molecular cloning of a new receptor-like-kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. Plant Journal* 11:45-52.
- Flor, H.H.** (1971). *Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Gallegos, E.R.** (1983). *Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacán. Universidad Autónoma de Chapingo. Grupo Editorial Gaceta, S.A. Chapingo, México.* 317 p.
- Gallo-Llobet, I.**, S. Pérez-Zárate y F. Siverio-de la Rosa (1999). *Búsqueda de resistencia a Phytophthora cinnamomi Rands en patrones de aguacate de raza antillana. Proceeding of World Avocado Congress IV, Acapulco., Mexico.*
- Gao, H.** y M.K. Bhattacharyya (2008). *The soybean-Phytophthora resistance locus Rps1-k encompasses coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat-like genes and repetitive sequences. BioMed Central Plant Biology* 8:29-42.
- Glazebrook, J.** (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review Genetic* 31:547-569.
- Gómez-Gómez, L.** y T. Boller (2002). *Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends Plant Science* 7:251-256.
- Graham, M.A.**, L.F. Marek y R.C. Shoemaker (2002). *PCR Sampling of disease resistance-like sequences from a disease resistance gene cluster in soybean. Theoretical and Applied Genetics* 105:50-57.
- Hammond-Kosack, K.E.** y J.D.G. Jones (1996). *Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell* 8:1773-1791.
- Ingvarsen, C.R.**, B. Schejbel y T. Lübberstedt (2008). *Functional markers for resistance breeding. En: Lüttge, U., Beyschlag W. y Murata J. (eds), pp. 61-87. Progress in botany, vol. 69, part 2. Springer, Berlin.* 178 p.
- Kamoun, S.H.** (2001). *Nonhost resistance to Phytophthora: novel prospects for a classical problem. Current Opinion Plant Biology* 4:295-300.
- Kanazin, V.**, L.F. Marek y R.C. Shoemaker (1996). *Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proceeding National Academy of Science, USA.* 93:11746-11750.
- Kilian, A.**, B.J. Steffenson, M.A. Saghai Maroof y A. Kleinbofs (1994). *A RFLP markers linked to the durable stem rust resistance gene Rpg1 in barley. Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:298-301.
- Kuc, J.** (1982). Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32:854-960.
- Lamb, C.J.**, M.A. Lawton, M. Dron y R.A. Dixon (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56:215-224.
- Lefebvre, V.** y A. Palloix (1996). *Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-Phytophthora capsici Leonian. Theoretical and Applied Genetics* 96:503-511.
- Leister, D.**, A. Ballvora, F. Salamini y C. Gebhardt (1996). *A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. Nature Genetic* 14:421-429.
- Meyers, B.C.**, D.B. Chin, K.A. Shen, S. Sivaramakrishnan, D.O. Lavelle, Z. Zhang y R.W. Michelmore (1998). The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817-1832.
- Newett, S.D.E.**, J.H. Crandly y C.F. Balerdi (2002). *Cultivars and rootstocks. En: Whiley, A.W., Schaffer B. y Wolstenholme B.N. (eds), pp. 161-187. Avocado: Botany, production and uses. CABI Publishing.* 445 p.
- Nimchuk, Z.**, T. Eulgem, B.F. Holt III y J.L. Dangl (2003). *Recognition and response in the plant immune system. Annual Review Genetic* 37:579-609.
- Pel, M.A.**, S.J. Foster, T.H. Park, H. Rietman, G. van Arkel, J.D.G. Jones, H.J. Van Eck, E. Jacobsen, R.G.F. Visser y E.A.G. Van der Vossen (2009). Mapping and cloning of late blight resistance genes from *Solanum venturii* using an inter-specific candidate gene approach. *Molecular Plant Microbe Interactions* 22:601-615.
- Pflieger, S.**, V. Lefebvre y M. Causse (2001). *The candidate gene approach in plant genetics: a review. Molecular Breeding* 7:275-291.
- Pink, D.A.C.** (2002). *Strategies using genes for non-durable resistance. Euphytica* 1:227-236.
- Riggs, R.D.** y J.A. Wrather (1992). *Biology and management of the soybean cyst nematode. St Paul, MN: APS Press.* 127 p.
- Rodrigo, I.**, P. Vera, R. Frank y 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.**, S. Uknes y E. Ward (1994). *Systemic acquired resistance. Plant Physiology* 104:1109-1112.
- SAGARPA (2007).** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: SIACON, Sistema de Información Estadística.
- Sanseverino, W.**, G. Roma, M. De Simone, L. Faino, S. Melito, E. Stupka, L. Fruscianty y M.R. Ercolano (2009). PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Research* [internet]. Available from <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gkpv978v1>
- Sels, J.**, J. Mathys, B.M. De Coninck, B.P. Cammue y M.F. De Bolle (2008). *Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR*

- peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 10:1011-1016.
- Shavannor, M.S.**, M. *Steinau*, H.N. *Trick* y H.H. *Scot* (2010). Recombinant Rp1 genes confer necrotic or nonspecific resistance phenotypes. *Molecular Genetics and Genomics* 283(6):591-602.
- Sowka, S.**, L.S. *Hsieh*, M. *Krebitz*, A. *Akasawa*, B.M. *Martin*, D. *Starrett*, C.K. *Peterbauer*, O. *Scheiner* y H. *Breiteneder* (1998). Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry* 273(43):28091-28097.
- Staskawicz, B.J.** (2001). *Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance*. *Plant Physiology* 125:73-76.
- Tang, X.**, M. *Xie*, Y.J. *Kim*, J. *Zhou*. D.F. *Klessig* y G.B. *Martin* (1999). Overexpression of pto activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell* 11:15-30.
- Tanhuanpaa, P.** (2004). Identification and mapping of resistance gene analogs and a white rust resistance locus in *Brassica rapa* ssp. *Oleifera*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1039-1046.
- Téliz, O.D.** y P.F. *Marroquín* (2007). *Importancia histórica y socioeconómica del aguacate*. En: *Téliz, D.* (ed.), pp. 3-28. El aguacate y su manejo integrado (2da. edición), Editorial Mundi Prens. México.
- Van de Weg, W.E.** (1996). *Resistance to Phytophthora fragariae var. fragariae in strawberry: the Rpf2 gene*. *Theoretical and Applied Genetics* 94(8):1092-1096.
- Van Kan, J.A.L.**, G.F.J.M. *Van den Ackerveken* y P.J.G.M. *De Wit* (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant Microbe Interactions* 4: 52-59.
- van Loon, L.C.**, W.S. *Pierpoint*, Th. *Boller* y V. *Conejero* (1994). Recommendations or naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reports* 12:245-64.
- van Loon, L.C.**, M. *Rep* y C.M. *Pieterse* (2006). *Significance of inducible defense-related proteins in infected plants*. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Vidales, F.J.A.** y R.J.J. *Alcántar* (1999). *Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (Phytophthora cinnamomi Rands) del aguacate (Persea americana Mill.)*. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5:255-259.
- Vleeshouwers, V.G.A.A.**, W. *Van Dooijeweert*, F. *Govers*, S. *Kamoun* y L.T. *Colon* (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210:853-864.
- Vogel, J.**, T.K. *Raab*, C. *Schiffy* S.C. *Somerville* (2002). *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:2095-2106.
- Wang, G.L.**, W.Y. *Song*, D.L. *Ruan*, S. *Sideris* y P.C. *Ronald* (1996). The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Plant Molecular Microbe Interactions* 9:850-855.
- Yan, G.P.**, X.M. *Chen*, R.F. *Line* y C.R. *Wellings* (2003). Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics* 106:636-643.
- Yu, Y.G.**, G.R. *Buss* y M.A. *Saghai-Marooif* (1996). *Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site*. *Proceeding National Academy of Science, USA*. 93:11751-11756.
- Zentmyer, G.A.** (1985). *Origin and distribution of Phytophthora cinnamomi*. *California Avocado Society Yearbook* 69:89-94.
- Zentmyer, G. A.** (1992). *The Avocado Quarterly*, Research Gazette 21:3-17.

## V.- JUSTIFICACIÓN

Debido a la necesidad de seleccionar portainjertos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) del banco de germoplasma (INIFAP Uruapan), resistentes a *P. cinnamomi*, se han seleccionado 2 genotipos con potencial tolerancia al oomiceto. Estos requieren ser evaluados y caracterizados para determinar la posible fuente de resistencia. Una alternativa es a través de la identificación de genes candidatos que confieren resistencia contra el oomiceto *P. cinnamomi*.

## VI. HIPÓTESIS

La tolerancia en genotipos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) a la enfermedad causada por *Phytophthora cinnamomi*, se asocia a la expresión de genes de resistencia

## VII. OBJETIVOS

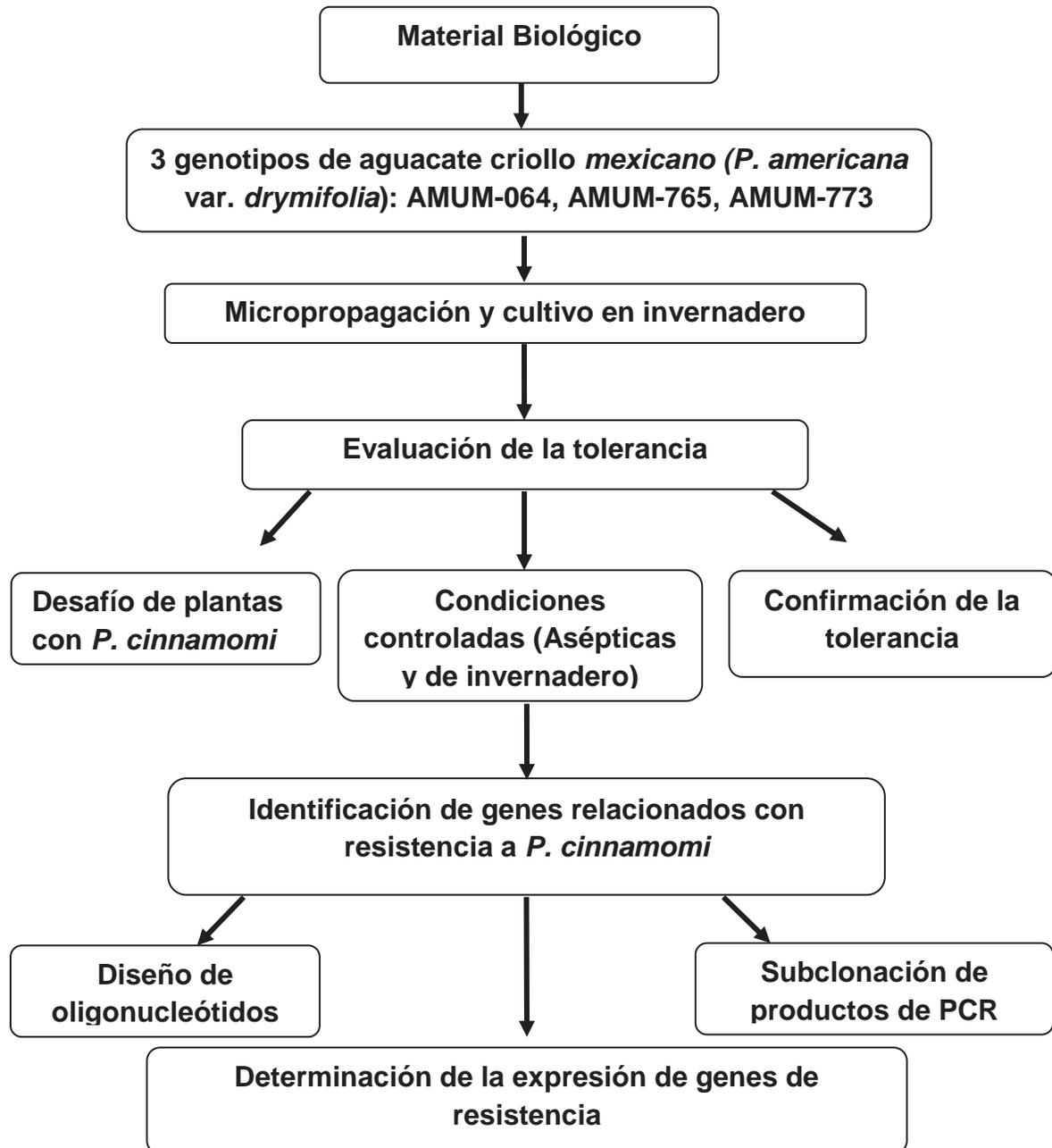
### 7.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar genes relacionados con resistencia a *Phytophthora cinnamomi* en genotipos tolerantes de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).

#### 7.1.1. Objetivos específicos

- 1) Establecer cultivos *in vitro* de tres genotipos de aguacate criollo para conseguir su micropropagación y cultivo en invernadero.
- 2) Determinar la resistencia en los genotipos de aguacate criollo mediante pruebas de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*.
- 3) Identificar genes relacionados con resistencia a *P. cinnamomi*.
- 4) Determinar la expresión del genes identificados en un genotipo de aguacate criollo tolerante a *P. cinnamomi*.

## VIII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



## IX. RESULTADOS

### CAPÍTULO I. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*).

**Marco Antonio Cortés-Rodríguez**, López-Gómez Rodolfo, Martínez-Pacheco Mauro Manuel, Suárez-Rodríguez Luis María, Hernández-García Alejandra, M. Ercelia Ángel Palomares, Ignacio Vidales Fernández and Salgado-Garciglia Rafael. 2011. *In vitro* propagation of avocado Mexican race (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Acta Horticulturae* (Aceptado para su publicación) (Anexo 1).

#### Abstract

A successful protocol was developed for *in vitro* propagation of avocado Mexican race (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Axillary buds, derived from developing shoots of field grown trees in a germplasm bank (INIFAP, Uruapan, Michoacán, México), were established on basal medium MS (Murashige and Skoog) with 30 g/L sucrose, 1 g/L activated charcoal, 0.4 mg/L ascorbic acid, 1 g/L commercial fungicide Tecto 60, gelled with 4 g/L phytigel. This medium was optimal for proliferation and elongation of the new shoots, the explants showed between 1-2 axillary new shoots 45 days post culturing. The *in vitro* response to the hormones was evaluated subculturing the new shoots in MS medium supplemented with benzyladenine (BA) at 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 mg/L in combination with indol-3-butyric acid (IBA) at 0, 0.1, 0.25, 0.5 or 1.0 mg/L. The greatest percentage (71.3%) of shoot induction was achieved with 0.5 mg/L of BA and 0.1 mg/L of IBA, producing 3-5 shoots 90 days post culturing, with a maximum length of 2.25 cm. Rooting was readily achieved upon transferring the microshoots onto MS supplemented with 0.5 mg/L IBA after 90 days of culture. Micropropagated plantlets were acclimatized and successfully grown in greenhouse.

**Key words:** Axillary bud, micropropagation, organogenesis, shoot proliferation.

#### INTRODUCTION

Propagation of avocado rootstocks has been accomplished almost exclusively by seed propagation; however this procedure cannot guarantee the genetic homogeneity of the material, since avocado breeds by cross-pollination, which produces highly heterozygotic seedlings (Köhne, 1992). Because of this fact, clonal propagation is essential when homogeneous plant rootstocks are requested. Rootstocks resistant to drought conditions, floods, saline soils and calcareous soils, as well as for resistance to *Phytophthora cinnamomi* can be propagated by

this means. The best results in avocado clonal propagation have been described by Frolich (Frolich and Platt, 1972), achieved by double grafting, a technique that is expensive and time consuming (Brokaw, 1987).

Tissue culture propagation of avocado has been described using axillary buds of adult avocado plants (Barceló-Muñoz et al., 1999), however the morphogenetic capacity is better in juvenile tissues than adult material (Pliego-Alfaro and Murashige, 1987). Shoot tips from avocado seedlings and juvenile tissues have been used successfully for *in vitro* establishment of different avocado materials (Nel et al., 1982; Cooper, 1987; Barceló-Muñoz et al., 1990; Pliego-Alfaro et al., 1999; Capote et al., 2000). However, the use of juvenile materials has the disadvantage of genetic variability by the previous seed propagation of stock plants (Castro et al., 1995). Thus, effective regeneration from mature avocado explants would overcome this problem. This paper reports an effective method for micropropagation of avocado Mexican race via organogenesis using axillary buds from mature explants.

## **MATERIAL AND METHODS**

Three accessions of avocado (773, 765 and 064) grown in the INIFAP germplasm bank (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Uruapan, Michoacán, México), were used as a source of explants. Shoots from mature plants (3.0 cm long) were soaked in distilled water for 30 min and washed three times with sterile distilled water. Explants were dipped in 70% ethanol for 2 min after washing, then surface sterilized with 20% commercial sodium hypochlorite (containing, 6% w/v available chlorine) added with a fungicide thiabendazole (Tecto 60) (1 g/L) for 20 min with gentle stirring. Explants were rinsed three times in sterile distilled water. Young leaves and basal portions of shoots injured by the aseptic technique were removed and 1.5 cm long explants (nodal sections with axillary buds) were cultured.

The basic nutrient medium consisted of MS (Murashige and Skoog, 1962) medium with 30 g/L sucrose and vitamins, adjusted to pH 5.7 with 0.1 N NaOH, solidified with 4 g/L phytigel, supplemented with 1 g/L activated charcoal, 0.4 mg/L ascorbic acid and, 1 g/L Tecto 60 and sterilized (autoclaved for 1 h at 120°C). Cultures were maintained at 25±1°C under a 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent light at 36 µmol/m<sup>2</sup>s.

To evaluate the effect on shoot proliferation on the three avocado accessions, after 45 days of initial culture, the axillary new shoots were recultured on MS medium with 30 g/L sucrose and 4 g/L phytigel containing benzyladenine (BA) (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 mg/L) singly or in combination with indol-3-butyric acid (IBA) (0, 0.1, 0.25, 0.5 or 1.0 mg/L). Data on percentage of responding explants (percentage of shoot induction), number and length of shoots per explant were recorded after 45 and 90 days of culture initiation. Actively growing shoots

(2.25 cm length) with a single node were used for rooting. Rooting medium consisted of MS macro- and micronutrients at full strength with IBA (0.5 mg/L). Cultures were maintained in a growth room under the conditions described above.

Plantlets were transferred into small plastic pots of 15 cm of diameter filled with peat moss and perlite (1:1), and covered with clear plastic bags and kept in a culture room (16 h of diffused cool-white light and at 25°C). One plantlet was transferred per pot. After two weeks, plastic bags were slit open to allow for circulation of outside air. After one week of open bag acclimatization, plastic bags were removed, and the plants were maintained in the culture room for another week. Throughout the acclimatization period, the water level in the plastic pots was monitored daily, and water was added as needed to maintain high humidity. Fully acclimatized plants were transferred to the greenhouse.

Normalized data were analyzed using a randomized complete block design with twenty replicates, and means were separated using the protected LSD test at  $P = 0.05$ .

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***In vitro* establishment**

Microbial contamination and browning of explants were the major difficulty in establishing avocado Mexican race cultures *in vitro*. The combination of fungicide treatment and surface sterilization with sodium hypochlorite resulted in significant control of contaminants, reducing the contamination from 70% to 30% of established explants contaminated. Browning was reduced by 70% in explants cultured on MS with ascorbic acid and activated charcoal (Figure 1A). The factors that contributed to limit explants death due to browning were the age of explants and the appropriate antioxidant treatment. Browning of explants and subsequent death is a common problem in tissue culture of plant species containing phenolic compounds and extra steps are usually incorporated in the tissue culture protocol to overcome this problem (McComb and Newton, 1981; Compton and Preece, 1986; Aminuddin et al., 1993).

### **Shoot proliferation**

Table 1 summarizes the morphogenetic responses of the axillary buds from mature explants of the three avocado accessions (773, 765 and 064) cultured on MS medium containing BA either alone or in combination with IBA. Explants cultured on MS medium without cytokinin failed to induce shoot proliferation. MS medium supplemented with different concentrations of BA (0.25 – 2.5 mg/L) in combination with IBA (0.1 - 0.25 mg/L) resulted in the induction of multiple shoots. The percentage of shoot induction, the number of shoots per explant and length of shoots increased under increased BA concentration up to 0.5 mg/L with 0.1 mg/L

IBA. The greatest percentage (71.3%) of shoot induction was achieved with 0.5 mg/L of BA and 0.1 mg/L of IBA (Table 1). This medium was optimal for shoot proliferation and length, the explants showed 1-2 adventitious shoots 45 days after the culture initiation and 3-5 shoots 90 later, with a maximum length of 2.25 cm (Figure 1B).



Figure 1. Establishment *in vitro* axillary bud (A), regenerated shoots on axillary bud (B), plantlet 90 days old (C), and micropropagated plant of *P. americana* var. *drymifolia* (270 days old) (D).

Table 1. Morphogenetic response of different accessions of avocado Mexican race cultured on MS medium supplemented with BA and IBA (90 days culture initiation).

Growth regulators (mg/L)		Shoot induction (%)			Number of shoots per explant			Length of shoots (cm)		
BA	IBA	773	765	064	773	765	064	773	765	064
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.1	64.9	61.6	44.3	1	1	1	0.99	1.1	0.78
0.5	0.1	71.3*	66*	55.8*	5*	5*	3*	2.25*	2.1*	1.8*
1.0	0.1	63.7	63.2	43.8	3	3	2	1.7	1.7	1.11
2.5	0.1	63.7	60.9	40	1	1	1	0.87	0.71	0.66
5.0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.25	71.3*	66.6*	52.8*	1	1	1	1.11	1.3	0.79
0.5	0.25	62.7	58.6	40	2	2	1	1.14	1.21	1.11
1.0	0.25	60.3	59.7	38.7	2	2	1	0.99	1.01	0.78
2.5	0.25	61.7	57.6	35.4	1	1	1	0.89	0.78	0.66
5.0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.5	53.6	52.8	36.7	1	1	1	1.09	1.02	0.87
0.5	0.5	55.4	50.9	38.6	1	1	1	0.77	0.74	0.66
1.0	0.5	50.1	49.8	35.2	1	1	1	0.54	0.49	0.43
2.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

n=20; LSD at 5% level (\*=0.90)

These results indicated that BA played an important role in the induction of multiple shoots and the length of them. However, BA and IBA at higher concentrations not only reduced the number of shoots formed but also resulted in stunted growth of the shoots. MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 0.1 mg/L IBA supports maximum number of shoot formation for the three avocado accessions tested in this work. Similar results were reported in *Melia azedarach* (Scocchi and Mroginski, 2004), *Vitis vinifera* (Aazami, 2010) and *Ficus anastasia* (Ameena et al., 2010). Regeneration of different cultivars or varieties of avocado has been already investigated using MS medium supplemented with BA and IBA (Bower et al., 1983; González and Salazar, 1984; Schall, 1987; Barceló-Muñoz and Pliego-Alfaro, 2003; Zulfiqar et al., 2009).

## Rooting

Rooting was readily achieved upon transferring the microshoots onto MS basal semi-solid medium supplemented with 0.5 mg/L IBA after 90 days of culture

(Figure 1C). We obtained higher rooting percentage, when comparing cultivars, the 773 accession shoots exhibited best rooting (57.5%) followed by 765 accession (50%) and then 064 accession (40%). The average root number per rooted explant obtained by the three accessions was 2.25 (2.3 cm length). The findings are in agreement with those observed in *P. americana* rootstock IV-8 (Barceló-Muñoz et al., 1990).

### **Acclimatization**

Micropropagated plantlets maintained *in vitro* (90 days old), were acclimatized and successfully grown in soil (peat-moss and perlite, 1:1). The acclimatized plantlets were successfully established in greenhouse with 70% survival (Figure 1D).

The significant contribution of the present report is the improvement of micropropagation of *P. americana* var. *drymifolia* through multiple shoots from axillary buds derived of mature explants. The development of appropriate techniques for *in vitro* culture and micropropagation of avocado Mexican race is necessary for germplasm collections, breeding program and mass propagation.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The financial support to M.A. Cortés Rodríguez (CONACYT), Project CONACYT 2009-C01-117-130IC, CIC/UMSNH RSG/2009. For the revision of the manuscript to J.T. Ascencio-Ibañez PhD.

### **Literature cited**

- Aazami, M.A. 2010. Effect of some growth regulators on *in vitro* culture of two *Vitis vinifera* L. cultivars. Romanian Biotech. Lett. 15(3):5229-5232.
- Ameena, A.H. S., Malki, A. and Khaled M.S.E. 2010. Influence of auxin and cytokinin on *in vitro* multiplication of *Ficus anastasia*. African J. Biotech. 9(5):635-639.
- Aminuddin, J.S.K., Anis, M. and Balasubramaniyan, V.R. 1993. Regeneration of *Piper betel* from callus tissue. Curr. Sci. 65:793-796.
- Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F. and Barea J.M. 1990. Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) en fase juvenil. Actas Hort. 1:503-506.
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C.L., Simón-Pérez, E. and Pliego-Alfaro, F. 1999. Micropropagation of adult avocado. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58:11-17.
- Barceló-Muñoz, A. and Pliego-Alfaro, F. 2003. Micropropagation of avocado. p. 519-542. In: S.M. Jain and K. Ishii (eds.), Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Bower, J.P., Alcock, C.M. and Fraser, C. 1983. Progress in tissue culture as a possible means of rapid propagation for avocado cv. Duke-7. Inf. Bull., Citrus and Subtrop. Fruit Res. Inst. 132:15-20.

- Brokaw, W.H. 1987. Avocado clonal rootstock propagation. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 37:97-103.
- Capote, M., Rodríguez, N.N. and Blanco, M. 2000. *In vitro* propagation of avocado. Trop. Fruits Newsletter 36/37:3-7.
- Castro, M., Oyanedel, E. and Cautín, R. 1995. *In vitro* shoot proliferation in avocado (*Persea americana* Mill.) induced by CPPU. Proc. World Avocado Congress III. p. 223-226.
- Compton, M. and Preece, J.E. 1986. Exudation and explants establishment. News Int. Assoc. Plant Tiss. Cult. 50:9-18.
- Cooper, P.A. 1987. Advances in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). Acta Hort. 212:571-575.
- Frolich, E.F. and Platt, R.G. 1972. Use of etiolation technique in rooting avocado cuttings. Calif. Avo. Soc. Yrb. 55:97-109.
- González, R.H. and Salazar, G.S. 1984. Root induction and vegetative development from avocado plantlets (*Persea Americana* Mill.). Calif. Avo. Soc. Yrb. 68:167-171.
- Köhne, J.S. 1992. Field evaluation of Hass avocado grown on Duke-7, G-6 and G755C rootstocks. Proc. II World Avocado Congress. Riverside, USA, p. 301-303.
- McComb, J.A. and Newton, S. 1981. Propagation of kangaroo paws using tissue culture. J. Hort. Sci. 56:181-183.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15:473-479.
- Nel, D.D., Kotze, J.M. and Snyman, C.P. 1982. *In vitro* propagation of *Persea indica*. Calif. Avo. Soc. Yrb. 66:167-168.
- Pliego-Alfaro, F., Barceló-Muñoz, A., Simón-Pérez, E., de la Viña-Nieto G., Sánchez-Romero, C. and Perán-Quesada R. 1999. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill.): problemas y limitaciones. Rev. Chapingo S. Horticult. 5: 239-244.
- Schall, S. 1987. Propagation of avocado (*Perseaa americana* Mill., cv. Fuerte) by microcutting *in vitro*. Fruits 42(3):171-176.
- Scocchi, A.M. and Mroginski, L.A. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*) under slow-growth conditions. Phyton 73:137-143.
- Zulfiqar, B., Nadeem, A.A., Touqeer, A. and Ishfaq, A. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte. Pak. J. Bot. 41(5): 2333-2346.

## CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A *Phytophthora cinnamomi* EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*)

**Marco Antonio Cortés-Rodríguez**, Indira Yunuén Acosta-Rivera, Alejandra Hernández-García, José de la Luz Sánchez-Pérez, Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas, Ignacio Vidales-Fernández, Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Rodolfo López-Gómez, Mauro M. Martínez-Pacheco and Rafael Salgado Garciglia. 2011. **Evaluation of tolerance to *Phytophthora cinnamomi* in micropropagated avocado plants of the Mexican race (*Persea americana* var. *drymifolia*)** (Se enviará a European Journal of Plant Pathology).

### **Abstract**

Three accessions of field grown avocado trees of the Mexican race (*Persea americana* var. *drymifolia*) (AMUM-064, AMUM-765 and AMUM-773) were selected from the INIFAP germplasm bank at Uruapan, Michoacán, México, to evaluate their tolerance to *Phytophthora cinnamomi*. Tolerance tests were made in radical systems of *in vitro* micropropagated material of the selected accessions using both three-month-old plantlets and 12-month-old acclimatized and greenhouse cultivated plants, which were inoculated by submersion in *P. cinnamomi* zoospore suspension ( $2 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>) during three hours avoiding root injury. Inoculated plants were transplanted to sterile soil that was saturated with water during 15 days. After inoculation, 3-month-old *in vitro* propagated plantlets were kept under aseptic conditions and 12-month-old acclimatized plants were kept in the greenhouse. Plant mortality and root rot percentages were recorded 8 and 15 days after inoculation. Eight days after inoculation the mortality of plantlets cultured under aseptic conditions ranged from 10 to 70%. Fifteen days after inoculation plantlets of accession AMUM-064 had 100% mortality, while those from accessions AMUM-765 and AMUM-773 only showed a mortality of 30% and 10%, respectively. At the latter time after inoculation, plants of accessions AMUM-765 and AMUM-773 displayed 40% and 10% mortality, respectively, while those of accession AMUM-064 showed 100% mortality. Root rot was much lower on tolerant (accessions AMUM-765 and AMUM-773) relative to non tolerant (AMUM-064) plants. Plants from accession AMUM-773 showed the highest tolerance to *P. cinnamomi*. Since the pathogen was recovered from all inoculated accessions, tolerant plants are not immune.

**Keywords:** avocado accessions, root rot, tolerant plants, zoospores.

## Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) is one of the most important crops in Mexico due to the number of tons produced and because it generates thousands of jobs and high profits from exports of fruit (FAOSTAT 2005). In Mexico, a commercial avocado tree consists of a rootstock, generally of the Mexican race (*P. americana* Mill. var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S.F. Blake), on which a commercial cultivar is grafted. Thus, the producer faces phytosanitary problems that affect both the scion and the rootstock (Sánchez-Pérez 2001).

Avocado presents serious diseases, in extreme cases causing the death of the tree, and in general, a 10 to 40% decrease in production accompanied by a 15 to 30% reduction in fruit quality. Root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands is one of the most destructive diseases on avocado orchards worldwide and has been an economically limiting factor of production of the crop in Australia, Mexico, South Africa, USA, and seventy other countries (Zentmyer et al. 1994; Erwin and Ribeiro 1996; Sánchez-Pérez 2001; Pegg et al. 2002). Root rot is characterized by a gradual tree decline that eventually leads to death of severely infected trees. Aerial symptoms are usually characterized by a mild to moderate chlorosis, small leaves, partial defoliation, reduced seasonal growth and poor vigor. Feeder roots exhibit a partial or complete necrosis (Zentmyer 1980; Zentmyer et al. 1994; Erwin and Ribeiro 1996; Latorre et al. 1998).

Due to a short period between generations and a high reproductive capacity, under favorable disease conditions such as in wet soil or soils having excessive water content this oomycete has the potential to cause death of most of the fine feeding roots of the host. The control of this pathogen requires a combination of several management practices designed to reduce its reproduction and to increase the tolerance of the host during the infection. Additional management practices include prevention, chemical and biological control, and the use of resistant rootstocks (Coffey and Guillemet 1987; Erwin and Ribeiro 1996). The most effective control takes place when all these strategies are used in an integrated pest management program.

Technologies to prevent tree loss on avocado orchards have focused on the propagation of homogeneous plants, *in situ* conservation and traditional breeding programs in order to identify materials with important agronomic characteristics to be used as rootstocks for avocado cultivated varieties. The genetic richness present in native materials can be of advantage for the isolation and identification of useful genes to generate new varieties (Ben-Ya'akov et al. 1992).

The evaluation of Guatemalan races with possible resistance to *P. cinnamomi* has been a common practice in the United States; nevertheless, such studies are lacking in Mexico. An avocado germplasm bank containing a collection of varieties of avocado trees has been established in Uruapan, Michoacan, Mexico by the

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Sánchez-Pérez 2001). Sánchez-Pérez et al. (2009) reported two accessions of avocado Mexican race (AMUM-765 and AMUM-773) with potential tolerance to *P. cinnamomi*. Due to the necessity to select avocado rootstocks tolerant to *P. cinnamomi*, the objective of the present work was to evaluate the tolerance of these materials in order to select tolerant accessions using micropropagated plants.

## Materials and methods

### Plant material

Three accessions of avocado Mexican race (AMUM-064, AMUM-765 and AMUM-773) (*P. americana* Mill. var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S.F. Blake) were micropropagated from apical buds of adult trees grown in the INIFAP germplasm bank, and the resulting material was used to perform tolerance tests. *In vitro* plantlets were grown for three months in MS (Murashige and Skoog 1962) basal semi-solid medium supplemented with 0.5 mg l<sup>-1</sup> indol-3-butyric acid. Three-month-old micropropagated plantlets of the three studied accessions were acclimatized and successfully established and grown in the greenhouse to produce 12-month-old avocado plants (Cortés-Rodríguez et al. 2011).

### Phytophthora isolate

*P. cinnamomi* was isolated from necrotic roots of an avocado tree of the Mexican race (*P. americana* var. *drymifolia*) grafted with the cultivar Hass that was located in a commercial avocado orchard in Uruapan, Michoacán, Mexico. The isolate was identified according to its morphology (Erwin and Ribeiro 1996). The mating type corresponded to A2. *P. cinnamomi* isolate was routinely grown at 25°C ± 1°C on 17 gL<sup>-1</sup> potato dextrose agar media (PDA, Bioxon, Mexico), or corn meal agar media (BBL™, USA).

### Zoospore production

*P. cinnamomi* was grown on V-8 medium during 10 days at 25°C, after which the media containing mycelium was fractionated in 0.5 to 1 cm<sup>2</sup> cubes that were placed on Petri dishes with non-sterile soil extract (0.1%). The extract was prepared by mixing 10 g of soil in one liter of distilled water with continuous shaking (660 rpm) during 3 hours filtered in a Buchner funnel with filter paper. *P. cinnamomi* mycelium was kept in Petri plates with soil extract and incubated at 25°C in the dark. The soil extract was changed every day to induce sporulation. After 10 days, the plates were incubated at 4°C during 60 min and kept at room temperature for 30 min, to stimulate zoospore release. Zoospore concentration was determined by counting in a Neubauer chamber and the final suspension was adjusted to 2 x 10<sup>4</sup> zoospores mL<sup>-1</sup>.

### **Zoospore inoculation**

Three-month-old micropropagated plantlets maintained *in vitro* and plants grown for 12 months in the greenhouse were inoculated with *P. cinnamomi*. Roots of plants from both growing systems used were carefully washed avoiding root injury and each plant was submerged for 3 hrs in  $2 \times 10^4$  zoospore  $\text{mL}^{-1}$  suspension in a 1-liter flask. Afterwards, the inoculated plants were transplanted to sterile peat moss and enough sterile water was added until the substrate became saturated. The three-month-old micropropagated plantlets were kept during 15 days in a growth chamber under aseptic conditions at 25°C, a 16 h light photoperiod, a light intensity of  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and 100% relative humidity. The 12-month-old plants were kept in the greenhouse at a daily maximum temperature of 25° to 30°C and 70% relative humidity. Roots of control avocado plants of the three accessions were submerged in water and the plants were cultivated under the same conditions. Treatments were distributed at random with ten repetitions each and single plants were considered as an experimental unit.

### **Disease symptoms**

Root rot and mortality percentages, were determined 8 and 15 days after inoculation, when all disease symptoms were recorded. Root colonization by the pathogen was confirmed after keeping necrotic roots for a week in sterile distilled water in Petri plates. Afterwards, the Petri plates containing the roots were placed under the optical microscope and observed with a 10X objective. The presence or absence of coenocytic mycelia and sporangia was recorded. Rotted roots were washed thoroughly, dried out on sterile paper and plated out on PARPH selective media to determine the presence of the pathogen (Jeffers and Martin 1986).

### **Results and discussion**

Three-month-old micropropagated avocado plantlets of accessions AMUM-064, AMUM-765 and AMUM-773 that were inoculated with *P. cinnamomi* showed different tolerance levels. Eight days after inoculation with zoospores, three-month-old plantlets of accession AMUM-064 showed 70% mortality, while those of accessions AMUM-765 and AMUM-773 showed only 10% mortality. After 15 days, three-month-old plantlets from accession AMUM-064 had 100% mortality, whereas the same from accessions AMUM-765 and AMUM-773 showed 30% and 10% mortality, respectively (Table 1). The 12-month-old plants of accession AMUM-064 presented susceptibility to the attack of *P. cinnamomi*, with 60 and 100% mortality at 8 and 15 days after inoculation, respectively, while the same from accession AMUM-765 had a mortality of 40% 15 days after inoculation. Within this treatment, plants from accession AMUM-773 showed the highest level of tolerance with a mortality of only 10% (Table 1). At that time, the control plants from all studied accession remained healthy (100% survival) (Table 1).

Root rot percentage was determined at the same time intervals: Ten percent of inoculated three-month-old plantlets cultivated *in vitro*, showed root rot, but none of the roots of the 12-month-old plants cultivated in the greenhouse presented

damage. After 8 days of inoculation, the three-month-old plantlets of accession AMUM-064 showed 50% of root necrosis, contrasting with 10% in accessions AMUM-765 and AMUM-773 (Table 2). Root rot increased after 15 days of inoculation, when all inoculated plants of accession AMUM-064 showed 100% of root rot. At the latter time after inoculation, the root rot percentage of three-month-old plants from accession AMUM-765 was of 20%, and on the 12-month-old plants, of 50%. On inoculated plants of accession AMUM-773, only three-month-old plants cultivated in aseptic conditions presented 10% of root rot, while 12-month-old plants maintained in the greenhouse showed healthy roots that appeared to be undamaged by the infection (Table 2).

Table 1. Mortality percentages of 3-month-old and 12-month-old avocado Mexican race plants of three selected accessions after 8 and 15 days of inoculation with *P. cinnamomi* zoospores.

ACCESSION/ TREATMENT	MORTALITY (%)			
	8 <sup>a</sup>		15 <sup>a</sup>	
	3-month-old	12-month-old	3-month-old	12-month-old
AMUM-064/Control	0	0	0	0
AMUM-765/Control	0	0	0	0
AMUM-773/Control	0	0	0	0
AMUM-064/Inoculated	70	60	100	100
AMUM-765/Inoculated	10	20	30	40
AMUM-773/Inoculated	10	0	10	10

<sup>a</sup>Days after inoculation. n=10 plants.

Table 2. Root rot percentages of 3-month-old and 12-month-old avocado Mexican race plants of three selected accessions after 8 and 15 days of inoculation with *P. cinnamomi* zoospores.

ACCESSION/ TREATMENT	ROOT ROT (%)			
	8 <sup>a</sup>		15 <sup>a</sup>	
	3-month-old	12-month-old	3-month-old	12-month-old
AMUM-064/Control	10	0	10	0
AMUM-765/Control	10	0	10	0
AMUM-773/Control	10	0	10	0
AMUM-064/Inoculated	50	70	100	100
AMUM-765/Inoculated	10	30	20	50
AMUM-773/Inoculated	10	0	10	0

<sup>a</sup>Days after inoculation. n=10 plants.

Fifteen days after inoculation, all plants of accession AMUM-064 developed root rot showing 100% root necrosis and 100% mortality. Therefore, accession AMUM-064 was shown to be susceptible to the pathogen attack. However, three-month-old plants of accession AMUM-765 showed 30% mortality with 20% of root rot, while the same from accession AMUM-773 had 10% mortality but only 10% of root rot. Extended watered saturation periods may injure avocado roots due to anoxia. This may have occurred in the three-month-old plantlets grown under aseptic conditions, where relative humidity was of 100%. Flooding favors root and collar rot caused by *P. cinnamomi* on avocado and several other host species. These conditions promote the production of sporangia and zoospores. Furthermore, soil saturation predisposes the trees to infection. The anoxia in roots facilitates penetration and invasion by *P. cinnamomi* (Browne and Mircetich 1988; Bowers and Mitchell 1990; Wilcox and Latorre 1994).

Control three- and 12-month-old plantlets did not show any infection symptoms and remained healthy after 30 days, when the experiment was discarded (Figures 1A, 1B). Fifteen days after inoculation, only one plant from accession AMUM-773 showed wilting, 90% of these plants behaving as the non-inoculated control plants (Figures 1C, 1D). Susceptible plants (accession AMUM-064) presented chlorotic and necrotic leaves, 50% of which abscised 8 days after inoculation, and died 15 days after inoculation (Figure 1E). By that time after inoculation, 12-month-old plants from accessions AMUM-064 and AMUM-765 showed wilting in 10 and in 4 out of 10 plants, respectively, and displayed leaf chlorosis and necrosis (Figure 1F). According to the above described results, plants from accession AMUM-773 showed a higher tolerance rate to *P. cinnamomi* than those from accession AMUM-765.

Optical microscopic observations of root segments kept in water revealed that susceptible plants were colonized with mycelium (Figure 2A) which formed sporangia (Figure 2B), unlike to non-treated control plants (Figure 2C) or inoculated tolerant accessions, in which external colonization was not observed. Since the pathogen was reisolated on selective media from the three studied accessions, a fungistatic effect containing the pathogen must have been active in the roots of tolerant accessions. Therefore, these accessions display tolerance rather than immunity.

The use of micropropagated clones has been recommended for the evaluation of plant resistance against *P. cinnamomi*, both because it is a quick and easy way to select a large number of tolerant materials (Dolan and Coffey 1986), and because plants are genetically homogeneous. Our results demonstrate the feasibility of testing tolerance to *P. cinnamomi* in a short time using micropropagated plants of the avocado Mexican race inoculated with a zoospore suspension.

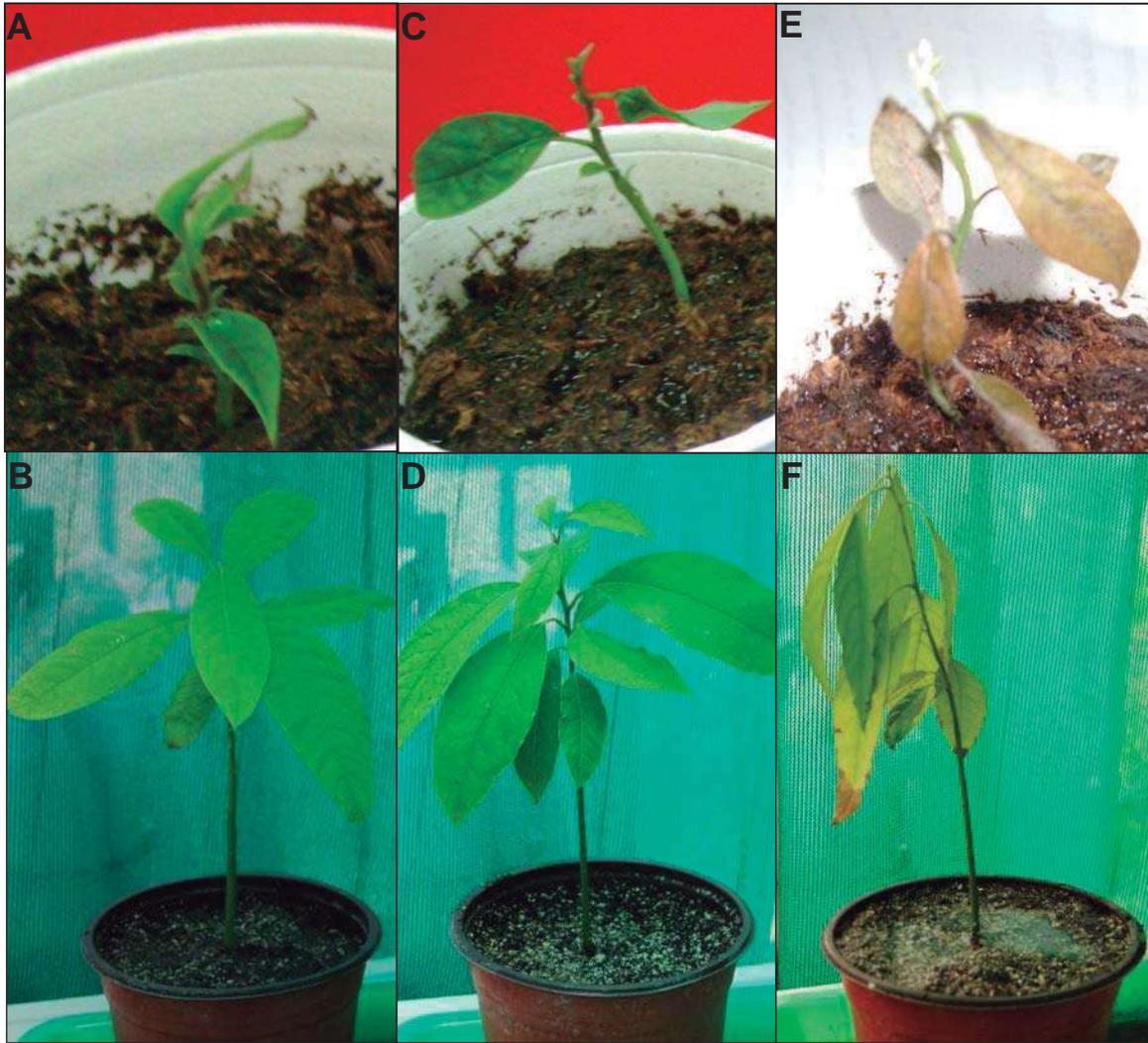


Figure 1. Mexican race avocado micropropagated plants grown in peat moss: A, Control three-month-old plantlet (accession AMUM-773); B, Control 12-month-old plant; C, Inoculated 3-month-old plantlet (accession AMUM-773); D, Inoculated 12-month-old plantlet (accession AMUM-773); E, Inoculated three-month-old plantlet (accession AMUM-064); F, Inoculated 12-month-old plant (accession AMUM-064). Fifteen days after inoculation.

Several tests have been developed to test avocado resistance to *P. cinnamomi* but not all of them have proven to be reliable since the plants that appeared to be tolerant turned out to be susceptible in the field. Exposing the roots to a zoospore suspension has shown the best results (J. Menge, personal communication).

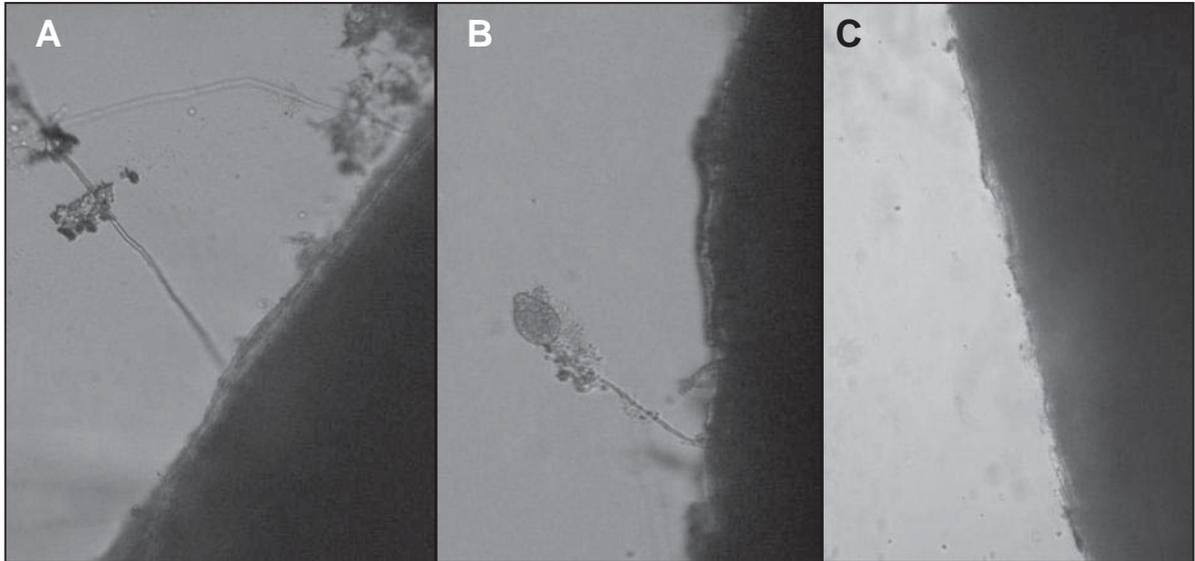


Figure 2. Root segments observed under the microscope (10x): A, *P. cinnamomi* mycelium colonizing a susceptible plant; B, Sporangium formation in a susceptible plant; C, Control plant. A and B, 15 days after inoculation.

Therefore, the accessions that showed tolerance in this study are good candidates for controlling the pathogen under field conditions.

One of the main problems in avocado production in Mexico is that a reliable rootstock is not available for the growers, which use a number of rootstocks that have not been tested for resistance to *P. cinnamomi*. Moreover, *P. cinnamomi* has been isolated from the roots of these rootstocks (S. Fernández, personal communication). Therefore, finding that accession AMUM-773 is tolerant to this pathogen causing great losses is very promising for avocado production. However, it is important to consider the reported variability of *P. cinnamomi* in the Mexican state of Michoacan (Ochoa-Fuentes et al. 2007) and additional testing of these accessions with different isolates is needed before massive propagation of these materials is attempted.

There is also an urgent need to have uniformity in the rootstock used by avocado producers in nurseries, which currently use several native plants they believe to be tolerant to root diseases, most of the times without any actual proof of the existence of such tolerance. Providing producers with a tolerant rootstock, a practice that occurs in developed countries, will further enhance avocado production in the Mexican state of Michoacan.

The present research successfully developed a protocol to assess the tolerance and susceptibility of *P. americana* var. *drymifolia* accessions to *P. cinnamomi* using

micropropagated plants. The results herein presented are reliable for the selection of *P. cinnamomi* resistant avocado rootstocks that can be used in future breeding programs in Mexico.

## Acknowledgments

This research was financially supported by grants from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC/2.10) and CONACYT (47866) to Rafael Salgado Garciglia. Indira Yunuén Acosta Rivera and Marco Antonio Cortés Rodríguez were supported with a scholarship from CONACYT.

## References

Ben-Ya'acov, A., Buffer, G., Barrientos-Priego, A.F., De la Cruz-Torres, E., & López-López, L. (1992). A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I. General description of the international project and its findings. Proceedings of the II World Avocado Congress), pp. 535-541, Orange, CA.

Browne, G.T., & Mircetich, S.M. (1988). Effect of flood duration on development of *Phytophthora* rot and crown roots of apple. *Phytopathology*, 78,846-851.

Bowers, J.H., & Mitchell, D.J. (1990). Effect of soil-water matric potential and periodic flooding on mortality of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 80,1447-1450.

Coffey, M.D., and Guillemet, F.B. (1987). Avocado rootstocks. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, 71,173-179.

Cortés-Rodríguez, M.A., Vidales-Fernández, I., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M., Ángel-Palomares, M.E., Suárez-Rodríguez, L.M., Hernández-García, A., & Salgado-Garciglia, R. (2011). *In vitro* propagation of avocado Mexican race (*Persea americana* var. *drymifolia*). *Acta Horticulturae* (in press).

Dolan, T.E., & Coffey, M.D. (1986). Laboratory screening techniques for assessing resistance of four avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, 70, 115-118.

Erwin, D.C., & Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. (American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota, USA).

FAOSTAT. (2005). Aguacate Superficie cultivada (Ha)-Año 2005. Retrieved August 15, 2008 from [http://www.fao.org/waicent/portal/statistics\\_es.asp](http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp).

Jeffers, S. N., & Martin, S. B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70, 1038–1043.

Latorre, B.A., De Andraca, F., & Besoain, X. (1998). Tristeza del palto. ACONEX (Chile), 59,18-23.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 443-497.

Ochoa-Fuentes, Y. M., Martínez de la Vega, O., Olalde-Portugal, V., Cerna-Chávez, E., Landeros-Flores, J., Hernández-Castillo, F.D., & Flores-Olivas, A. (2007). Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25, 161-166.

Pegg, K.G., Coates, L.M., Korsten, L., & Harding, R.M. (2002). Foliar, fruit and soilborne diseases. (In A.W. Whiley, B. Schaffer & B.N. Wolstenholme (Eds.), *Avocado: Botany, Production and Uses* (pp. 299-338). CABI Publishing: Oxon, UK).

Sánchez-Pérez, J. de la L. (2001). Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México.

Sánchez-Pérez, J. de la L., Jaimes-Lara, M.G., Salgado-Garciglia, R., & López-Meza, J.E. (2009). Root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelia growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 595–601.

Wilcox, W.F., & Latorre, B.A. (1994). Pudrición radical y del cuello en frutales producidos por *Phytophthora*. ACONEX (Chile), 43, 5-12.

Zentmyer, G.A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. (Monograph 10, The American Phytopathological Society:St. Paul, Minnesota, USA).

Zentmyer, G.A., Menge, J., & Ohr, H. 1994. *Phytophthora* root rot. (In R. Ploetz, G.A. Zentmyer, W.T. Nishijima, K.G. Rohrbach, & H.D. Ohr (Eds.), *Compendium of Tropical Fruit Diseases* (pp. 77-79). APS Press, American Phytopathological Society: St. Paul, MI., USA).

### **CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN GENOTIPOS DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*) TOLERANTES A *Phytophthora cinnamomi*.**

#### **RESUMEN**

La reciente clonación de genes de resistencia contra diversos patógenos de diversas plantas, ha revelado que comparten motivos de secuencias conservadas. Esto proporciona la posibilidad de aislar numerosos genes de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de oligonucleótidos degenerados o específicos. Tres genotipos de aguacate mexicano criollo (*P. americana* var. *drymifolia*) provenientes del Banco de Germoplasma de Aguacate de INIFAP (Uruapan, Michoacán, México), fueron seleccionados con fines de identificar genes de resistencia asociados a la tolerancia al oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. El ADN del genotipo susceptible AMUM-064 y de dos genotipos tolerantes, AMUM-765 y AMUM-773, fue analizado mediante el método de PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados con base en las secuencias de mayor homología, para amplificar regiones de ADN de genes de resistencia (genes *R*) de otras plantas resistentes a *Phytophthora* spp. (*Cyp*, *LM6* y *Rps2*) y genes relacionados a patogénesis (genes *PR*) (*chs*, *pal*, *pg*, *PR5* y *stk*). Estos genes se amplificaron en los tres genotipos de aguacate criollo mexicano (AMUM-064, AMUM-765 y AMUM-773), confirmando la identificación de los genes *PR*, *chs*, *pal*, *stk* y *PR5*, mediante su secuenciación y análisis informático.

**Palabras Clave:** Genes *R*, Genes *PR*, oligonucleótidos degenerados, PCR.

#### **ABSTRACT**

The recent cloning of genes for resistance against diverse pathogens from a variety of plants has revealed that many share conserved sequence motifs. This provides the possibility of isolating numerous resistance genes by polymerase chain reaction (PCR) with both degenerate and specific oligonucleotide primers. Three genotypes of avocado Mexican race (*Persea americana* var. *drymifolia*) from the avocado germplasm bank of INIFAP (Uruapan, Michoacan, Mexico), were selected for the purpose of identifying resistance genes associated with tolerance to oomycete *Phytophthora cinnamomi*. The DNA of the susceptible genotype AMUM-064 and two tolerant genotypes, AMUM-765 and AMUM-773, was analyzed by PCR method using oligonucleotides designed based on the higher homology sequences, for amplifying regions of DNA of genes *R* from other plants resistant to *Phytophthora* spp. (*Cyp*, *LM6* and *Rps2*) and genes related to pathogenesis (genes *PR*), *chs*, *pal*, *pg*, *PR5*, and *stk*). These genes were subjected to amplification in the three genotypes of avocado Mexican race (AMUM-

064, AMUM-765 and AMUM-773), confirming the identification of genes *PR*, *chs*, *pal*, *stk*, and *PR5*, through its sequencing and computer analysis.

**Key words:** Genes *R*, Genes *PR*, degenerated oligonucleotide primers, PCR.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad más devastadora del cultivo de aguacate a nivel mundial es la producida por el oomiceto *P. cinnamomi*, conocida como “tristeza del aguacatero” o “pudrición de la raíz”. Este fitopatógeno ataca la raíz del árbol, el cual se debilita y generalmente muere. Se ha reportado que esta enfermedad ataca al aguacatero en unos 70 países, incluido México (Pegg *et al.*, 2002).

La mayor parte de las estrategias de control utilizadas contra oomicetos del género *Phytophthora*, hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos, esencialmente Ridomil (metalaxil) y el Aliette (fosetil Al), el tratamiento químico es muy costoso y su utilización no ha solucionado el problema debido a la variabilidad genética de la especie (Lamour *et al.*, 2007) y a la posible generación de resistencia en el patógeno (Erwin y Ribeiro, 1996). Los mecanismos de infección y la variabilidad presentada por el género *Phytophthora* no solo provocan el interés científico sino que puede ser la clave para producir cultivos que expresen resistencia duradera a enfermedades como la pudrición de la raíz. Trabajos previos sobre el uso de portainjertos de aguacate resistentes al ataque de este oomiceto indican que este podría ser el método más satisfactorio para controlar la pudrición de las raíces del aguacatero causada por *P. cinnamomi*. Estudios realizados en California (USA) reportan como relativamente resistentes a los portainjertos Duke 6, Duke 7, G 22, G 6, Huntalis, Barr Duke y Thomas (Pegg y Forsberg, 1982; Tuset-Barrachina, 1983; Gabor y Coffey, 1991; Zentmyer, 1992).

A través de los genes de resistencia (genes *R*) las plantas pueden defenderse de los patógenos ya que el reconocimiento mediado por estos genes interacciona con proteínas específicas de los patógenos involucradas en la patogénesis y de este modo la planta detiene la infección. Asimismo, otros genes de defensa como los genes *PR*, su expresión es inducida durante las primeras etapas de la infección, correspondiendo a un mecanismo de resistencia efectivo presente en diversas plantas (Deng y Gmitter, 2003).

Se ha descrito que los genes *R* comparten motivos comunes tales como repeticiones ricas en leucina (LRR) y sitios de unión de nucleótidos (NBS), lo cual ofrece amplias oportunidades para aislar secuencias genéticas homólogas en diversas especies vegetales (Yan *et al.*, 2003). El estudio de los genes de resistencia facilita el desarrollo de estrategias de mejoramiento y el seleccionar plantas resistentes disminuirá el uso de controladores químicos, minimizará las pérdidas en la cosecha y evitará que se genere resistencia en los patógenos. Los

genes *R* identificados en genotipos de jitomate, soya, colza y papa, se han descrito porque están involucrados en la tolerancia a *P. cinnamomi* (van Kan *et al.*, 1991; Riggs y Wrather, 1992; Kilian *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1996; Buschges *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1999; Graham *et al.*, 2002; Arranz *et al.*, 2003; Shavannor *et al.*, 2010). El estudio de los genes *R* y *PR* identificados en la resistencia a *Phytophthora* spp. en otras plantas representa una importante alternativa para utilizar el enfoque de genes candidato para identificar y relacionar genes *R* o *PR* con la resistencia a *P. cinnamomi* en genotipos de aguacate criollo mexicano.

Es por ello, que en la presente investigación se muestran los resultados de la identificación de genes de defensa en genotipos de aguacate criollo mexicano, uno susceptible (AMUM-064) y dos tolerantes a *P. cinnamomi* (AMUM-765 y AMUM-773).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

Árboles adultos de tres genotipos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*): AMUM-064 (genotipo susceptible), AMUM-765 y AMUM-773 (genotipos tolerantes), seleccionados del Banco de Germoplasma de INIFAP Uruapan, Michoacán, México.

### **Oligonucleótidos**

Para la amplificación de genes de defensa se utilizaron oligonucleótidos específicos para chalcona sintasa (*chs*), fenilalanina amonioliasa (*pal*), poligalacturonasa (*pg*) y serín treonín cinasa (*stk*). Para la identificación de genes *R* y en particular para el gene *PR5*, se diseñaron oligonucleótidos degenerados en base a reportes de genes de resistencia de diversas plantas resistentes a *Phytophthora* ssp.: *Cyp* (cisteín proteasa de *Solanum tuberosum*), *LM6* (proteína LRR de *Glycine max*), *PR5* (proteína relacionada a patogénesis en *Solanum lycopersicon*) y *Rps2* (proteína de resistencia en *Brassica rapa* subs. *oleifera*) (Cuadro 1).

Los oligonucleótidos degenerados fueron diseñados con base en las regiones conservadas de las secuencias de aminoácidos de los genes de resistencia reportados previamente.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó usando hojas frescas de tejidos jóvenes de tres genotipos de aguacate criollo mexicano (AMUM-064, AMUM-765 y AMUM-773), utilizando el protocolo de extracción DNeasy Plant Maxi (Quiagen) (bajo el siguiente protocolo:

Se pesó 1 g de tejido por muestra moliéndose en un mortero y adicionando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Enseguida se colocó 0.1 g del material pulverizado adicionando 5 mL de buffer AP1 y 50 µL de β-mercaptoetanol con 10 µL de RNAsa. Posteriormente fue centrifugado a 4000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante (transferir) a la columna QIAshredder Maxi spin colocada previamente en su respectivo tubo de 50 mL para centrifugar a 4000 rpm por 5 min, se agregó al sobrenadante en un tubo nuevo 7.5 mL (1.5 volúmenes) de solución buffer AP3/E para posteriormente transferir esta mezcla en una columna Dneasy Maxi Spin dentro de su tubo de 50 mL y centrifugar a 4000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 12 mL de solución buffer AW para centrifugar a 4000 rpm por 10 min, transfiriendo la columna a un tubo nuevo y estéril de 50 mL y agregándole 750 µL de solución buffer AE para recuperar el ADN y almacenarlo a -20 °C.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes *R* y *PR* de genotipos de aguacate criollo mexicano.

GEN	SECUENCIAS DE OLIGONUCLÉOTIDOS
<i>chs</i>	5'-CCC GGG TCC TGG TCG TCT GTT CTG -3' 5'- CAC GCC CCA CTC GAT CCC ATC AC -3'
<i>Cyp</i> *	5' TTY GCY GAT YTR ACY AAY GA 3' 5' GAR AAH GCC CAR CAR CTY CCR 3'
<i>LM6</i> *	5' CRA CHC TTG CWM KRG MWR TT 3' 5' CYA ABG GAA GKC CWG AAG CAT 3'
<i>pal</i>	5' CCG TAC GCC GCC CTC CGA ACT T 3' 5' GTC CTG CTC TGC GCT TTG AAC AT 3'
<i>pg</i>	5' ACA TGG CAG GGA GGT TCA 3' 5' TGG CCC ATG TCA CTT TTT C 3'
<i>PR5</i> *	5' ACH AAR ATG GCH CGY ATH TGG G 3' 5' RTC YTG WGG RTA RCT ATA DGC A 3'
<i>Rps2</i> *	5' TGA RCA AGA RAC GKT TCT TG 3' 5' TCT CMG CGW GCC GGC GAA TY 3'
<i>stk</i>	5' CAA GCG GCA GGA TGG TTT ACT 3' 5' ACG CAT TCA GGT GTT GTG GTT T 3'

\*Los nucleótidos en las posiciones degeneradas están representados por código de letras: A,C,G=V; A,C,G,T=N; A,T,G=D; C,T=Y; T,C,G=B; A,T,C=H; C,G=S; T,G=K; A,C=M; A,T=W y A,G=R

## **Amplificación del ADN por PCR**

Se amplificaron las muestras usando oligonucleótidos degenerados de los genes *R* y oligonucleótidos específicos de los genes *PR* (Cuadro 1). La amplificación por PCR fue hecha para los oligonucleótidos degenerados en un volumen final de 10  $\mu$ L, incluyendo 0.2  $\mu$ L dntp's, 1.0  $\mu$ L de buffer taq, 0.4  $\mu$ L, de  $MgCl_2$ , 0.4  $\mu$ L Platinum®*Taq* DNA Polymerasa, 1.5  $\mu$ L de cada primer (Fw y Rv) y 1.0  $\mu$ L de ADN, ajustando como volumen final con 4.0  $\mu$ L de  $H_2O$  estéril. El perfil de amplificación usado fue: desnaturalización 94°C/5 min por un ciclo, seguida por 35 ciclos de desnaturalización 94°C/30 seg, alineamiento 55°C/30 seg y extensión 72°C/1 min y con un paso final de extensión a 72°C/10 min.

En relación a los oligonucleótidos específicos, se utilizó el mismo volumen de reacción con condiciones de corrida como se menciona a continuación: desnaturalización 94°C/5 min por un ciclo, seguida por 35 ciclos de desnaturalización 94°C/30 seg, alineamiento 55°C/45 seg y extensión 68°C/1:15 min y una extensión final de 72°C/5 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y visualizados con bromuro de etidio bajo lámpara con luz ultravioleta.

## **Purificación de bandas de los productos de PCR**

Una vez concluida la electroforesis y a través del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, se obtuvieron las bandas de los genes de interés para su purificación cortando con una navaja los fragmentos de ADN transfiriéndolos a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril. Se le adicionaron 300  $\mu$ L de ADB Buffer™ para incubarlo a 55°C/10 min hasta que la agarosa del gel estuviera completamente disuelta, esta solución se transfirió a una columna Zymo-Spin 1™ en un tubo de colecta, se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min, descartando el sobrenadante y se adicionaron 200  $\mu$ L de Buffer de lavado. Se centrifugó a 10,000 rpm/30 seg y se descartó el sobrenadante. Este paso de lavado se repitió nuevamente, para finalmente adicionar 10  $\mu$ L de agua directamente a la columna matriz, misma que se introdujo en un tubo de 1.5 mL, para centrifugar a 10,000 rpm/60 seg con el fin de eluir el ADN obteniendo una solución final de 20  $\mu$ L de ADN de alta pureza.

## **Clonación y secuenciación**

Los fragmentos de PCR que fueron purificados tanto de los genes *R* como de los genes *PR* se clonaron en el vector pGEM®-T Easy de Promega®, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los plásmidos recombinantes fueron enviados para su secuenciación al LANGE BIO del CINVESTAV Campus Guanajuato. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos del genebank del NCBI.

## RESULTADOS

### Obtención del ADN de hojas de aguacate criollo mexicano

La extracción de ADN fue más efectiva utilizando el método DNeasy Plant Maxi®, ya que se obtuvo DNA genómico de buena calidad, libre de compuestos secundarios, proteínas y polifenoles que co-precipitan con el ADN, los cuales inhiben la reacción de amplificación de ADN. La cantidad del ADN fue determinada a través de la relación de absorbencia A260/A280, obteniendo 50 µg cuya concentración se evaluó en geles de agarosa al 1% visualizados con bromuro de etidio bajo luz UV. Se obtuvieron rendimientos entre 200-500 ng de ADN por 100 mg de tejido fresco. En la figura 1 se muestra una fotografía de un gel de agarosa donde se demuestra la presencia del ADN de hoja de cada uno de los tres genotipos de aguacate, indicativo de la calidad y cantidad óptimas para continuar con los objetivos de la presente investigación.

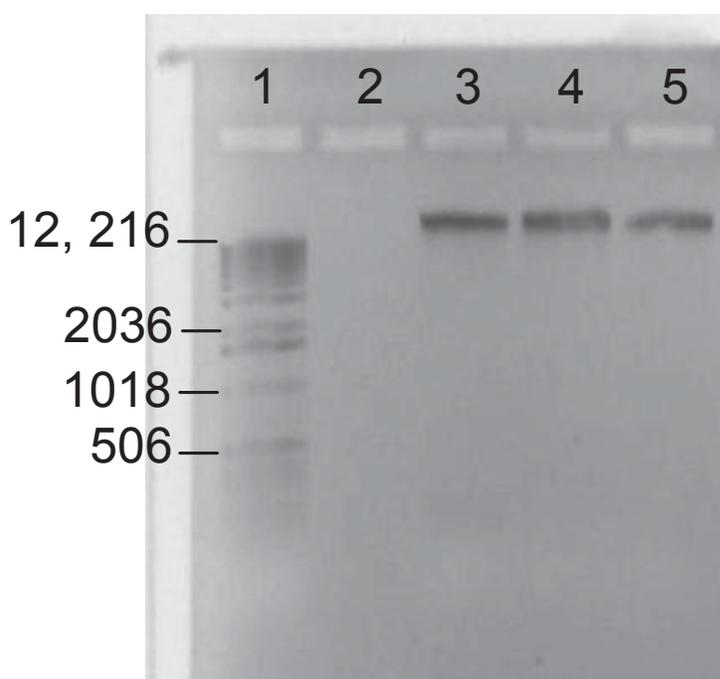


Figura 1. Electroforesis representativa de una extracción de ADN de hojas de aguacate criollo mexicano. Carriles: 1) 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); 2) Buffer de extracción (QIAGEN); 3) ADN de AMUM-064; 4) ADN de AMUM-765; 5) ADN de AMUM-773.

## Amplificación de fragmentos de ADN de aguacate

El ADN extraído resultó adecuado para la amplificación mediante la técnica de PCR, ya que cada una de las muestras presentó el patrón de bandas esperado de los genes *Cyp* de 210 pb, *LM6* de 448 pb, *Rps2* de 230 pb. En una primera amplificación, pudo observarse la presencia de fragmentos correspondientes a los diferentes genes en estudio (Lin *et al.*, 1995) (Figura 2).

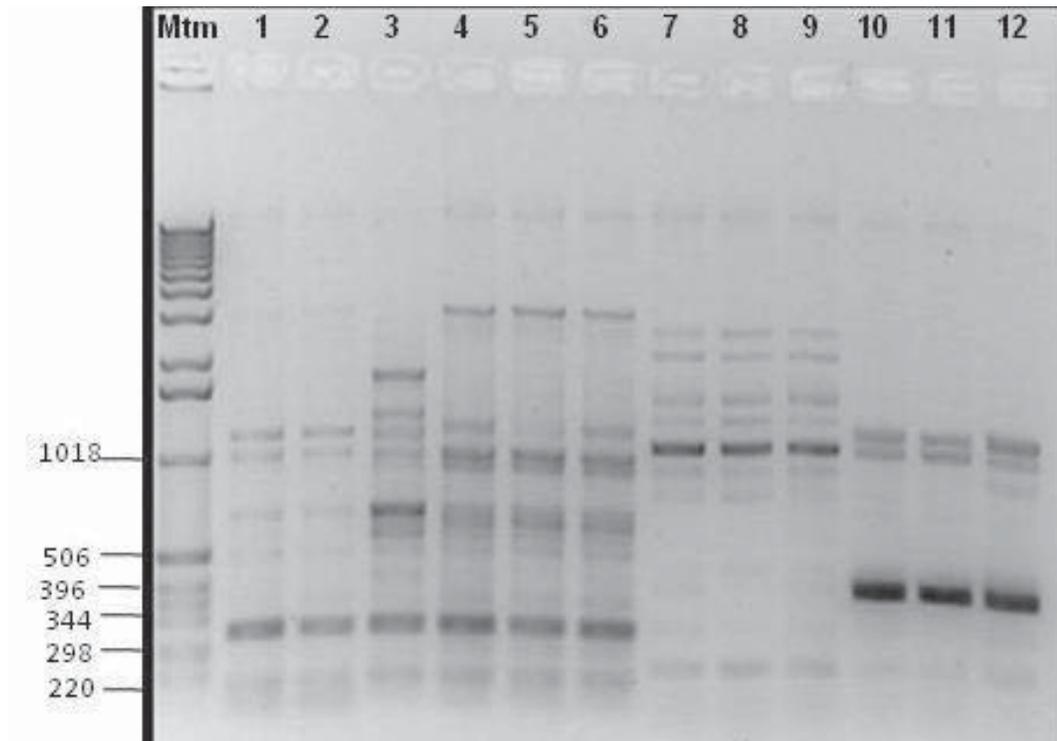


Figura 2. Electroforesis en agarosa de amplificados por PCR con oligonucleótidos degenerados, bajo las condiciones de amplificación descritas en métodos:

Carriles: Mtm, 1 Kb Marcador de tamaño molecular DNA ladders Track1 (Invitrogen): Amplificaciones para los genes: 1) *Cyp* de AMUM-064; 2) *Cyp* de AMUM-765; 3) *Cyp* de AMUM-773; 4) *Rps2* de AMUM-064; 5) *Rps2* de AMUM-765; 6) *Rps2* de AMUM-773; 7) *PR5* de AMUM-064; 8) *PR5* de AMUM-765; 9) *PR5* de AMUM-773; 10) *LM6* de AMUM-064; 11) *LM6* de AMUM-765; 12) *LM6* de AMUM-773.

Sin embargo, bajo estas condiciones, no pudo obtenerse el fragmento de amplificación del gen *PR5* (Figura 3), por lo que éstas se modificaron para un segundo perfil de amplificación. Se modificó la temperatura y el tiempo en el alineamiento, así como la temperatura en la etapa de la extensión, encontrando la amplificación de dicho gen, correspondiente a una banda de un tamaño molecular de 388 pb (Figura 3). El tamaño de los amplificadores correspondió para cada uno de los genes específicos (*PR*), *chs* 510 pb, *pal* 390 pb, *pg* 500 pb y *stk* 490 pb (Figura 4).

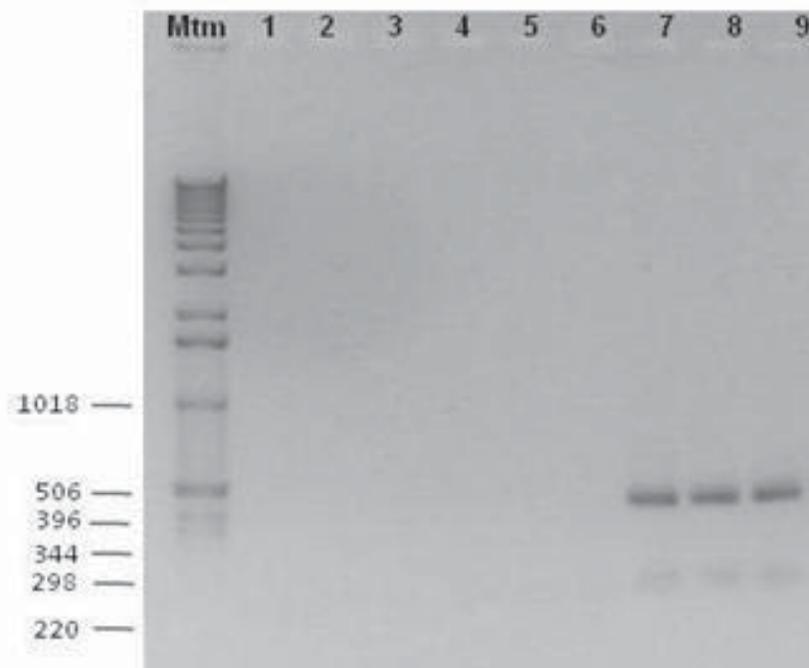


Figura 3. Electroforesis en agarosa de amplificadores por PCR con oligonucleótidos degenerados de los genes *Rps2*, *Cyp* y *PR5*, bajo las condiciones de amplificación descritas en métodos. Carriles: Mtm, 1Kb Marcador de tamaño molecular TrackI DNA ladders (Invitrogen); Amplificaciones para los genes: 1) *Rps2* de AMUM-064; 2) *Rps2* de AMUM-765; 3) *Rps2* de AMUM-773; 4) *Cyp* de AMUM-064; 5) *Cyp* de AMUM-765; 6) *Cyp* de AMUM-773; 7) *PR5* de AMUM-064; 8) *PR5* de AMUM-765; 9) *PR5* de AMUM-773.

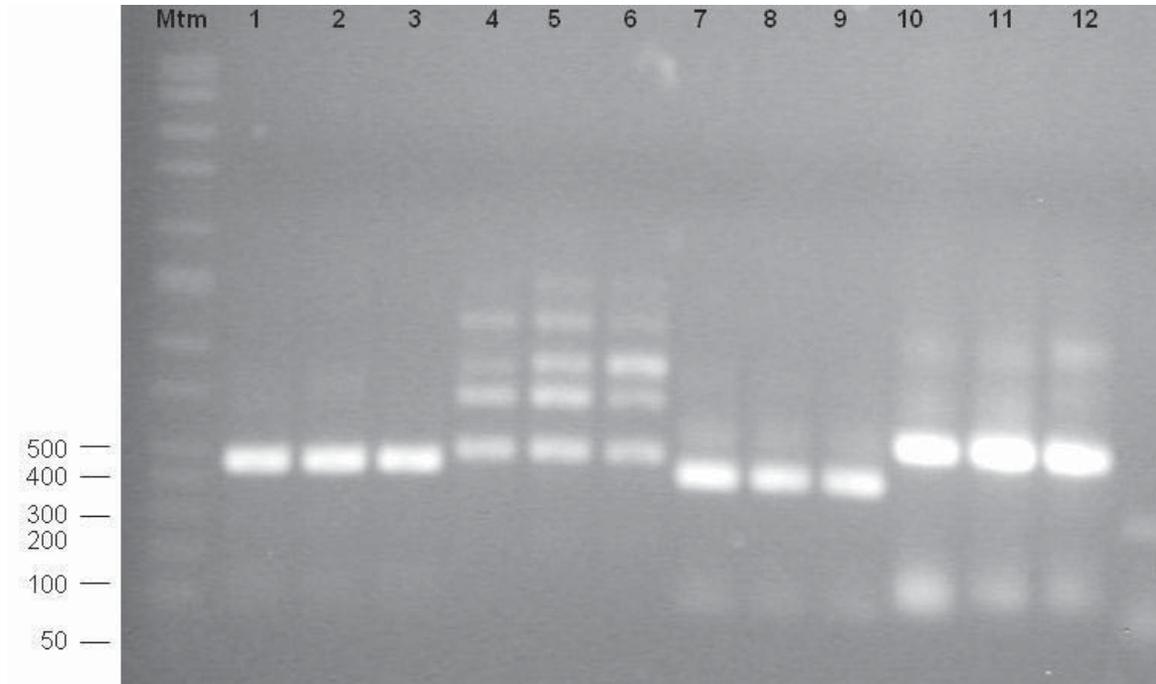


Figura 4. Electroforesis en agarosa de amplificados por PCR con oligonucleótidos específicos de los genes *stk*, *pg*, *pal* y *chs*, bajo las condiciones de amplificación descritas en métodos.

Carriles: Mtm, Marcador de tamaño molecular DirectLoad™ Wide Range Marker cat. D 7058 Sigma; 1) *stk* de AMUM-064; 2) *stk* de AMUM-765; 3) *stk* de AMUM-773; 4) *pg* de AMUM-064; 5) *pg* de AMUM-765; 6) *pg* de AMUM-773; 7) *pal* de AMUM-064; 8) *pal* de AMUM-765; 9) *pal* de AMUM-773; 10) *chs* de AMUM-064; 11) *chs* de AMUM-765; 12) *chs* de AMUM-773.

### Clonación de fragmentos amplificados

Una vez purificados los productos amplificados, se ligaron a los plásmidos pGEM T-Easy, con la siguiente mezcla de ligación: 1.0 µL de ADN, 0.5 µL del vector, 5.0 µL de Buffer, 1.0 µL de ligasa y 2.5 µL de agua para un volumen final de 10 µL, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5-α, mediante un electroporador. Se utilizaron cajas petri con medio LB sólido (Tryptona 10g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, para 1 litro de medio) con ampicilina (0.1 mg/mL de medio), 20 mL de IPTG (200 mg/ml) y 20 mL de X-Gal (20 mg/mL en dimetilformamida), para seleccionar las células transformadas por su coloración blanca (con el inserto de interés), descartando las colonias azules. Se extrajo el plásmido de las células transformadas, mediante cultivo en medio LB líquido y miniprep del plásmido (González *et al.*, 1995) y se realizó la restricción de colonias transformantes, utilizando la enzima EcoR I (Figura 5).

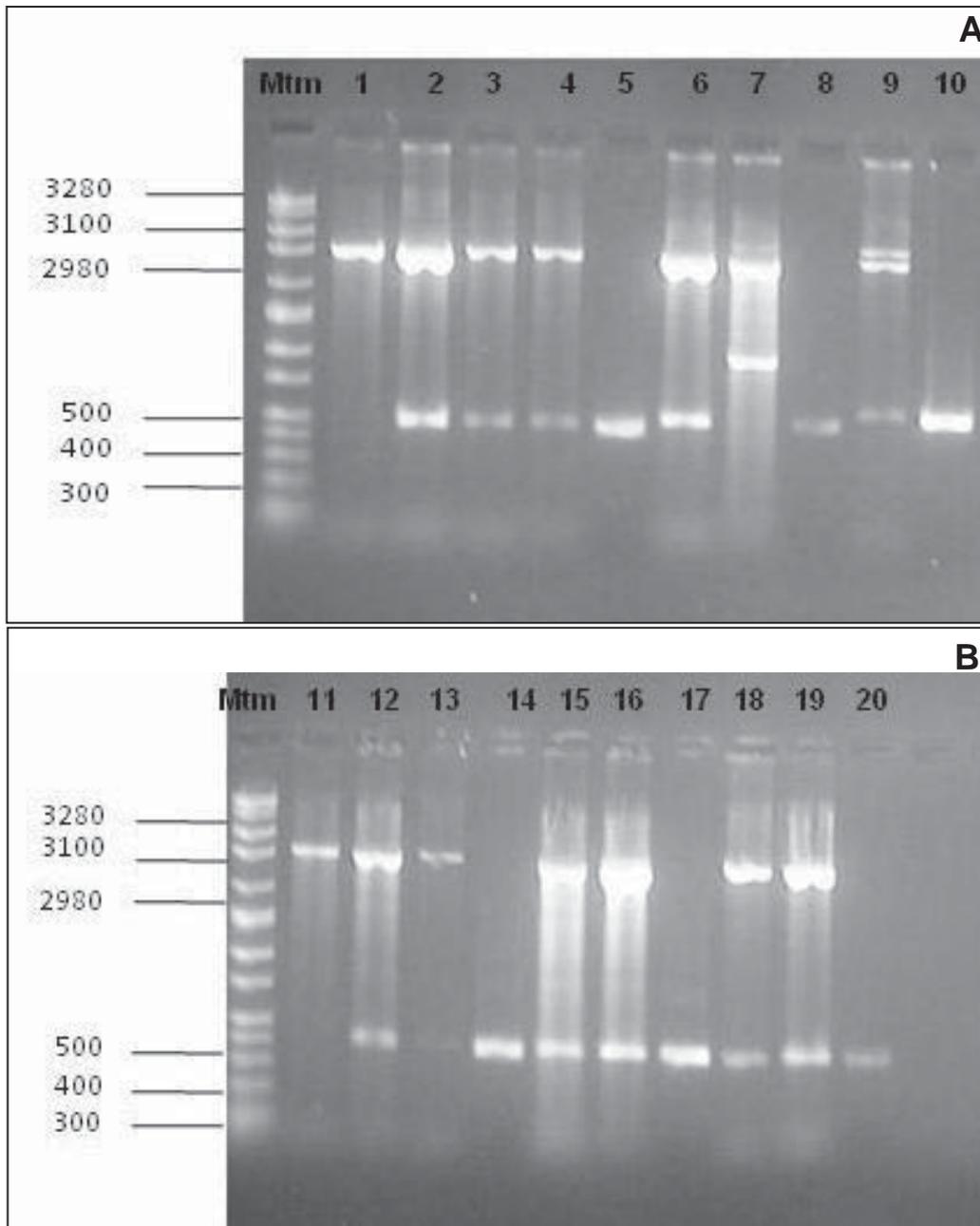


Figura 5. Electroforesis en agarosa para el análisis de restricción de las colonias transformantes con la siguiente mezcla de restricción: 1.0  $\mu$ L de ADN AMUM-773, 1.0  $\mu$ L de Buffer 10X, 0.5  $\mu$ L de la enzima EcoR1 y 7.5  $\mu$ L de agua, para un volumen final de 10  $\mu$ L. Carriles: Mtm, Marcador de tamaño molecular 3Kb DirectLoad™ Wide Range Marker cat. D 7058 Sigma ; 1) *pGEM-T*; 2) *stk1*; 3) *stk2*; 4) *stk3*; 5) *PCR stk*; 6) *pg1*; 7) *pg2*; 8) *PCRpg*; 9) *chs*; 10) *PCRchs*; 11) *pGEM-T*; 12) *pal1*; 13) *pal2*; 14) *PCR pal*; 15) *PR5-1*, 16) *PR5-2*; 17) *PCR PR5*; 18) *LM6-1*; 19) *LM6-2*; 20) *PCR LM6*.

Con los fragmentos amplificados de los genes *Cyp* y *Rps2*, no se obtuvieron los productos de clonación, obteniéndose los de los genes *LM6*, *PR5*, *chs*, *pal*, *pg* y *stk*.

## Secuenciación

Los productos de clonación obtenidos de cada uno de los genes fueron secuenciados. Solamente los que amplificaron para los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk*, mostraron una secuencia nucleotídica completa, los cuales amplificaron en los tres genotipos de aguacate criollo mexicano. Para confirmar su identificación, las secuencias fueron comparadas en la base de datos del GeneBank del NCBI, obteniendo una identidad para el caso de los genes *pal* y *stk* con diversos cultivares de *Persea americana* del 89% y 100% respectivamente, en tanto que para el gen *chs* con un 70% para aguacate (*Persea americana*), cebolla (*Allium cepa*) y becerrilla (*Misopates orontium*) (Cuadro 2) (Anexo 3).

## DISCUSIÓN

Con los avances en biología molecular es posible detectar secuencias de ADN de cultivos agrícolas, que tengan homología con genes que se han identificado como responsables de otorgar resistencia a enfermedades en otros cultivos. Diversos genes de resistencia (genes *R* y genes *PR*) se han identificado utilizando el método de PCR (Shen *et al.*, 1998). Mediante el uso de oligonucleótidos degenerados se han identificado genes *R* en soya, papa, arroz, arábido y lechuga (Kanasín *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Aarts *et al.*, 1998; Leister *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998).

Asimismo, con el uso de oligonucleótidos directos o específicos de genes de defensa o relacionados a patogénesis, la técnica de PCR ha sido una herramienta valiosa para la identificación de este tipo de genes (Trognitz *et al.*, 2002). Los genes como *Pto* (serin-treonín cinasa de tomate) que confieren resistencia a *Pseudomonas syringae* (Chen *et al.* 1998; Leister *et al.* 1996), el *Tha1* (taumatina) para resistencia a la roya en hojas de trigo (Faris *et al.*, 1999) y los genes de defensa *pal* (fenilalanina amonio liasa, PAL), *4Cl* (4-cumarato CoA ligasa), *chi* (chalcone isomerasa, CHI) y *chs* (chalcona sintasa) en perejil y frijol, han sido identificados utilizando oligonucleótidos con el método directo de PCR (Hahlbrock y Scheel, 1989; Logemann *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1996). En diversas plantas se han clonado e identificado genes *R* o genes *PR* que confieren resistencia a *Phytophthora* spp.: Gao y Bhattacharyya (2008) clonaron el gen *R* (*Rps1k*) en soya, que confiere resistencia a *P. sojae*; genes *PR* responsables de la defensa contra diversas especies de *Phytophthora*, que expresan principalmente las proteínas PR-1, PR-2 y PR-5 muestran actividad específica directa en contra de oomicetos (van Loon *et al.*, 2006); los genes *pal* y *4Cl*, también se han reportado que son inducidos por la infección con *P. infestans* (Fritzemeier *et al.*, 1987; Cuypers *et al.*, 1988).

Cuadro 2. Secuencias nucleotídicas de genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk* amplificados en ADN de los tres genotipos de aguacate criollo mexicano (AMUM-064, AMUM-763 y AMUM-773), comparadas en la base de datos del GeneBank del NCBI.

GEN	SECUENCIAS	Accesión	Descripción	Max. Ident.
<i>chs</i>	GAATTCGATTCCCAGGCTCTGGTCGTCTGTTCTGAAATCAGCGCC ATCTCCTCCGAGGACCCAGGACGAACACCTCCACGGCCTCACTG CAGAGGCCTTATTCGGAGACGGCGCAGCGGCTATGATCACGGCT CAGATCCAATCCTGACCATTGAAAAGCCCATCTACCAGATCGTCC GGGCCTCGCAGAGGATCGTCCCAGAGTGATGGTGCAGCCATA GGGCTGTTGAGGGAGGTGGGGCTCACGTACCACCTGTACAAGG ACATTCGGGGCTGGTTGAGGGGTGATTGAGGAATGTTTAGTA GAGGTGTTTGAGAGTTAGGTATTTGTATTGGAATGAATTGTTTT GGGTGGCTCATCCGGGTTTGCCTGCGATACTGGATCGGGTGGAG GTGAGGCTGGGGTTGGAGAGTGGGAAGTTAAGGGCTCCTAGGC ATGTGTTAGGGAGTTGGGAATGTGTCGAGTCTACTTTGGTGTT TGTGTTGGAGGAGATGAGGAGGTGTCGAGGGAAGAAGGGTGT AAGACAACGGGTGAGGGGATCGAGTGGGGCTGAATCACTAGT	BankIt14963 13 chs JQ080915	<i>Persea americana</i> Chalcone sintasa (CHS) mRNA (complete cds)	90%
<i>pal</i>	GAATTCGATTCCGTACGCCCCCTCCGAACCTCCCTCAATGGCTT GGTCCCAGATAGAGGTGATACGGAACCTCGACTCGCTCAATTGA GCGTGAAATCAACTCTGTCAACGACAACCCATTGATCGATGTCTC GAGGAACAAGGCGCTCCATGGAGGCAACTTCAAGGGACCCCAA TTGGGGTGTCCATGGACAACCCCGCTTGGCAATTGCTGCCATTG GGAAGCTCATGTTTCGCACAGTCTCTGAACCTGTTAATGACTTTTA CAACAATGGGCTGCCTTCAAATCTATCCGGGGGACGCAACCCGA GCTTGGATTATGGGTTCAAGGGGGCTGAGATTGCAATGGCAGCC TACTGCTCAGAGCTCCAATTCCTTCAAATCCAGTGACTAACCAT GTTCAAAGCGCAGAGCAGACAATCACTAG	BankIt14963 13 pal JQ080916	<i>Persea americana</i> Fenilalanina- amonioliasa (PAL) mRNA (complete cds)	89%
<i>PR5</i>	GATGCCATGGCCGGGGAAGTTGCAAGACCGGCGACTGCAAGGG CCTGCTCGAGTGCCAAGAGTACGGACAGCCACCCAAACCCCTGG CCGAATACGCGCTGAAGCAATACGCCGACCTCGACTGGATTGAT ATATCCCTGTAGATGGCTTCAACATTCATGGAGTTGAGCCCC MCCTCAGGTGGGTGCAAGGTTATGAGGTGCACTGCTGATATCAA GGCCAGTGTCTCGCAGAGCTCAAGGCAGATGATGGTTGCAACA ACCCCTGCACTGTTTATAAACTAATGAGTATTGTTGCGATAAAG GTGGTACCTGTGGGCCACTCCTTTGTCTAAGTTCTTCAAAGACA GATGCCCAGATGCCTATAGCT	GenBank: FJ840440.1	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> PR-5 gene, partial cds	100%
<i>stk</i>	GAATTCGATTCAAGCGGCAGGATGGTTACTTACACAACCTGTG GGACTCCCGCTTATGTTGCTCCTGAAGTGATA AGTAGAAAGGGTATGATGGTGCAAAGCTGACATTTGGTCTG TGGAGTGATATTATTTGTTCTTCTGGCTGGATA TCTTCCATTTGATGATTCAAATCTGATGGAGTTGTACAGGAAGGT TGGCAAAGCGGAATATAAATGCCCTAATTGGT TTCCACCAGAAGTGCCTAGGCTGCTAGCAAGGATTTTGGATCCG AACCCAAACTCGGATTTCAATTGCGAAGATC AAAGATAACTCTTGGTTCAAAGGGGATTTGAAGCAAAGTTTGC CAAAGGTGAAACAAAGTCCAAGGAATTGGCTCC CCTCGATACTGATGCAGCATTTGCTTCAAGTGTGCTGGTGTGCT TGACGTTAAACCAGAGTTAGTAAACCAAC ACCTGAATGCGTAATCACTAGT	BankIt14963 13 stk JQ080917	<i>Persea americana</i> cultivar Zutano_1 Serín-Treonín Cinasa (STK) (partial cds)	100%

Desafortunadamente ninguno de los genes *R* (*Cyp*, *LM6* y *Rps2*) mediante la amplificación con oligonucleótidos degenerados, así como el gen de la poligalacturonasa (*pg*), fue posible su secuenciación. Sin embargo, los resultados de esta investigación demuestran la presencia de los genes de defensa *chs*, *pal* y *stk*, así como el gen relacionado a patogénesis *PR5*, este último que codifica para la proteína osmotina, todos ellos involucrados en la defensa de plantas a algunas especies de *Phytophthora*.

Existen evidencias que apoyan la hipótesis que los genes de la defensa general en plantas están asociados con la resistencia a enfermedades. Tres de los cuatro genes que codifican las enzimas clave de la ruta de los fenilpropanoides (PAL, CHS y CHI), están fuertemente asociados con la resistencia (Faris *et al.*, 1999; Geffroy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). La osmotina, una proteína relacionada a patogénesis, codificada por el gen *PR5*, también ha sido asociada con efecto significativo sobre ciertas enfermedades, incluyendo las ocasionadas por *Phytophthora* (Lebowitz *et al.*, 1987; Lander y Botstein, 1989; Woloshuk *et al.*, 1991; Tanksley, 1993). En relación al gen *stk*, éste codifica para proteínas Serin-treonin cinasa (STK), importantes en la defensa a través de transducción de señales, incluyendo la activación de genes relacionados a patogénesis (genes *PR*), los cuales confieren resistencia local o sistémica (Bishop *et al.*, 2000; Tiffin y Moeller, 2006).

## CONCLUSIÓN

Se logró la identificación de los genes *chs*, *pal*, *pr5* y *stk* en los tres genotipos de aguacate criollo mexicano. Los resultados obtenidos con este método aparte de confirmar la presencia de dichos genes en el genoma de aguacate criollo mexicano, son alentadores para la búsqueda de genes candidatos relacionados con la resistencia a *P. cinnamomi*.

## LITERATURA CITADA

- Aarts, M.G., te Lintel H., Holub B., Beynon J. L., Stiekema W. J. y Pereira A. 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:251-258.
- Arranz, M., A.P. Eslava, Diaz-Minguez I.M. y Benito E.P. 2003. Hypervirulent strains of *Botrytis cinerea* show altered respiration. XII Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA. p. 385.
- Bishop, J.G., Dean A.M, Mitchell-Olds T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:5322-5327.

- Buschges, R., Hollricher K., Panstruga R., Simons G., Wolter M., Frijters A., van Daelan R., van der Lee T., Diergaarde P. y Groenendijk J. 1997. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88:695-705.
- Chen, X.M., Line R.F. y Leung H. 1998. Genomic scanning for resistance- gene analogs in rice, barley and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.*, 97:345-355.
- Cuypers, B., Schmelzer E. y Hahlbrock K. 1988. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1:157-160.
- Danesh, D. y Young N.D. 2002. Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of non TIR NBS-LRR genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 261-272.
- Deng, Z. y Gmitter F.G. 2003. Cloning and characterization of receptor Kinase class disease resistance genes candidates in citrus. *Theor. Appl. Genet.*, 108(1):53-61.
- Erwin, D.C. y Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul Minn. U.S.A.
- Fagoaga, C., Rodrigo I. y Conejero V. 2001. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7:175-85.
- Faris, J.D., Li W.L., Liu D.J., Chen P.D. y Gill B.S. 1999. Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98:219-225.
- Friedrich, K., Maddox L., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E. y Ryals J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1 a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7327-7331.
- Fritzemeier, K., Cretin C., Kombrink E., Rohwer F., Taylor J., Scheel D. y Hahlbrock K. 1987. Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and coumarate:CoA ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 85:34-41.
- Gabor, J. y Coffey R. 1991. Avocado Clonal rootstock production trial. *Proc. of Second World Avocado Congress*, pp. 305-310.

- Gao, H. y Bhattacharyya M.K. 2008. The soybean-*Phytophthora* resistance locus *Rps1-k* encompasses coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat-like genes and repetitive sequences. *BioMed Central Plant Biol.*, 8:29-42.
- Geffroy, V., Se´vignac M., De Oliveira J., Fouilloux G., Skroch P., Thoquet P., Gepts P., Langin T., Dron M. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of QTL with genes involved in specific resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13:287-296.
- Hahlbrock, K. y Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 40:347-369.
- Kamoun, S.H. 2001. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opinion Plant Biol.*, 4:295-300.
- Kanazin, V., Marek L.F. y Shoemaker R. C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11746-11750.
- Lamour, K.H., Win J. y Kamoun S. 2007. Oomycete genomics: new insights and future directions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 274:1-8.
- Lander, E.S. y Botstein D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121:185-199.
- Lebowitz, R.J., Soller M. y Beckmann J.S. 1987. Trait-based analyses for the detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in crosses between inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 73:556-562.
- Leister, D., Ballvora A., Salamini F. y Gebhardt C. 1996. A PCR approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.*, 14:421-429.
- Leister, D., Kurth J., Laurie D.A., Yano M., Sasaki T., Devos K., Graner A. y Schulze-Lefert P. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:370-375.
- Lin, W., Anuratha C.S., Datta K., Potrykus I., Muthukrishnan S. y Datta S.K. 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Nature Biotech.*, 13:686-691.

- Llano, G.A. y Álvarez E. 1999. Avances en la investigación para resistencia a *Phytophthora spp.* Seminario presentado en la Universidad Nacional Sede Palmira, Colombia; mayo 27 de 1999.
- Logemann, E., Parniske M. y Hahlbrock K. 1995. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:5905-5909.
- Palomino, C., Satovic Z., Cubero J.I. y Torres A.M. 2006. Identification and characterization of NBS-LRR class resistance gene analogs in faba bean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome*, 49:1227-1237.
- Pegg, K.G. y Forsberg L.I. 1982. Resistance to *Phytophthora cinnamomi* in callus tissue derived from three avocado cultivars. *Can. J. of Bot.*, 69(9):2026-2032.
- Pegg, K.G., Coates L.M., Korsten L. y Harding R.M. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. *In: Avocado: Botany, production and uses* (Whiley A.W., Schaffer B. y Wolstenholme B.N. eds.), CABI Publishing, pp. 299-338.
- Shen, K.A., Meyers B.C., Islam-Faridi M.N., Chin D.B., Stelly D.M. y Michelmore R.W. 1998. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11(8): 815–823.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.*, 27:205-233.
- Tiffin, P. y Moeller D.A. 2006. Molecular evolution of plant immune system genes. *Trends Genet.*, 22:662-670.
- Trognitz, F., Manosalva P., Gysin R., Niño-Liu D., Simon R., Herrera M.R., Trognitz B., Ghislain M. y Nelson R. 2002. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × Dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15(6):587–597.
- Tuset-Barrachina, J.J. 1983. Gummosis and root rot (*Phytophthora fungi*) in our citrus (Spain). Biological and pathological aspects. *Levante Agríc.*, 246:90-96.
- van Loon, L.C., Rep M. y Pieterse C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann. Rev. Phytopath.*, 44:135-162.
- Vleeshouwers, V.G.A.A., Dooijeweert W. Van, Govers F., Kamoun S. y Colon L.T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 210:853-864.

- Wang, X., Allen R., Ding X., Goellner M., Maier T., de Boer J.M., Baum T.J., Hussey R.S. y Davis E.L. 2001. Signal peptide-selection of cDNA cloned directly from the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14: 536–544.
- Woloshuk, C.P., Meulenhoff J.S., Sela-Buurlage M., Van den Elzen P.J.M. y Cornelissen B.J.C. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 3: 619–628.
- Yamada, T., Shiraishi T., Ichinose Y., Kato H., Seki H. y Murakami Y. 1996. Regulation of genes for phenylpropanoid synthesis in pea by elicitor and suppressor. *In: Molecular aspects of pathogenicity and resistance: Requirement for signal transduction* (Mills D., Kunoh H., Keen N.T. y Mayama S. eds.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A. pp.151-162.
- Yan, G.P., Chen X.M., Line R.F. y Wellings C.R. 2003. Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theor. Appl. Genet.*, 106:636-643.
- Yu, Y.G., Buss G.R. y Sagaimarroof M. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11751-11756.
- Zentmyer, G.A. 1992. *The Avocado Quarterly. Research Gazette*, 21:3-17.

## CAPÍTULO IV. EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN UN GENOTIPO DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*) TOLERANTE A *Phytophthora cinnamomi*.

### RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la expresión de algunos genes codificantes para proteínas relacionadas a respuestas de defensa contra patógenos. Los genes evaluados fueron chalcona sintasa (*chs*), fenilalanina amonio liasa (*pal*), el gen de la proteína tipo taumatina *PR5* y un gen codificante para una cinasa de serina/treonina (*stk*), identificados previamente en aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). El análisis se realizó en plantas de 12 meses de edad cultivadas en invernadero, de los genotipos AMUM-064 y AMUM-773, susceptible y tolerante a *Phytophthora cinnamomi*, respectivamente. Las plantas fueron inoculadas directamente en el sistema radical con una solución de  $2 \times 10^4$  zoosporas/mL y se tomaron muestras de raíz a las 0, 2, 4, 24 y 48 h después de la inoculación, para la extracción del ARN total. Para determinar los niveles de expresión de dichos genes, se obtuvieron los ADNc de cada uno de ellos, utilizando oligonucleótidos específicos diseñados en base sus secuencias nucleotídicas de los genes *PR*, y se determinó la abundancia de sus transcritos mediante un análisis cuantitativo de RT-PCR (qRT-PCR). Las muestras extraídas al tiempo inicial (0 h) se consideraron como tratamientos control. Los resultados mostraron que todos los genes evaluados tuvieron una expresión diferencial en la accesión tolerante a diferentes tiempos después de la inoculación con el patógeno. En pocas horas (2-24 h) los genes *chs* y *PR5* tuvieron valores de inducción de hasta 4 y 6 veces, respectivamente, comparados con sus controles. A las 48 h, el gen *pal* alcanzó niveles de expresión de hasta casi 70 veces en la accesión tolerante en relación con la susceptible. Nuestros resultados sugieren que estos genes y los mecanismos de defensa a los que están asociados, pueden estar implicados en la tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*.

**Palabras claves:** *chs*, *pal*, *PR5*, *stk*, qRT-PCR, expresión diferencial.

### ABSTRACT

This work was carried out with the aim of evaluating the expression of pathogenesis-related genes chalcone synthase (*chs*), phenylalanine ammonium lyase (*pal*), gene related to pathogenesis (*PR5*) and serine threonine kinase (*stk*), previously reported in avocado Mexican race (*Persea americana* var. *drymifolia*). The analysis was realized with 12-month-old plants cultivated in greenhouse of genotypes AMUM-064 and AMUM-773, susceptible and tolerant to *Phytophthora cinnamomi*, respectively. The plants were inoculated directly in the root system with a solution of  $2 \times 10^4$  zoospores/mL and root samples were taken at 0, 2, 4, 24 and 48 h after inoculation, for the extraction of total RNA. To determine the expression of these genes, we obtained the cDNA of each one of them, using

oligonucleotides primers designed on the basis of corresponding *PR* gene sequences, analyzing gene expression through the technique of quantitative RT-PCR (qRT-PCR), quantifying the transcript of each gene in the above-mentioned times. The cDNA of RNA extracted at the initial time (0 h) was considered treatment control. The results showed that all genes analyzed had a differential expression in the accession tolerant to different times, after inoculation with the pathogen. In early times (2-24 h), *chs* and *PR5* genes had values of induction up to 4 and 6 times, respectively, compared to their controls. At 48 h, the gene *pal* reached levels of expression of up to almost 70 times in the tolerant accession in relation to no tolerant plant. Our results suggest that these genes are associated to defense mechanisms and may be involved in tolerance to *Phytophthora cinnamomi*.

**Key words:** *chs*, *pal*, *PR5*, *stk*, qRT-PCR, differential expression.

## INTRODUCCIÓN

Los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola en los países tropicales y su combate se realiza básicamente mediante métodos químicos, lo cual tiene un costo tanto económico como ambiental (Oerke *et al.*, 1994; Arauz, 1998). Sin embargo, las plantas también son capaces de reaccionar y defenderse por sí solas, utilizando una serie de mecanismos naturales. Las interacciones planta-patógeno pueden presentar varios tipos de asociaciones, que dependen en gran parte del contenido genético de cada organismo. La resistencia inducida es una forma de defensa activa que involucra la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno (Browning, 1980).

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. Esta especificidad es más fácil de estudiar a nivel de cultivar o genotipos seleccionados, es decir, especies cultivadas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético para producir poblaciones de plantas altamente homogéneas en su contenido genético (De Wit, 1997).

El uso de las técnicas de la biología y la genética molecular ha generado gran cantidad de información acerca de los mecanismos utilizados por las plantas para defenderse de los fitopatógenos. Los nuevos conocimientos confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a la expresión o represión de genes cuyos productos participan en las diferentes vías metabólicas que participan en la defensa. Estos genes, llamados genes de defensa, conforman la base de la resistencia horizontal. Los mecanismos de defensa de la resistencia horizontal, ya sea por la producción de fitoalexinas, proteínas PR, deposición de lignina, reacción hipersensible o SAR,

son los responsables de actuar en contra del patógeno invasor, por ello es que este tipo de resistencia es básicamente poligénica (Collinge *et al.*, 1994).

Dentro de estos genes de defensa, la síntesis de *novo* de enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI), como respuesta a la infección por patógenos se ha demostrado de manera general en las plantas (Cuypers *et al.*, 1988). Estas enzimas están involucradas en la producción de fitoalexinas y en la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas como la lignina, evitando el avance de patógenos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Barber y Mitchel, 1997). Paralelamente, existen mecanismos de defensa que involucran proteínas, denominadas proteínas relacionadas a patogénesis también llamadas proteínas PR, que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos. Actualmente se ha identificado un gran número de estas proteínas PR, ejemplo de algunas de ellas son las PR2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas), PR3 (quitinasas) y PR5 (tipo osmotina o taumatina), de las cuales se ha demostrado una alta expresión de sus genes durante la patogénesis, por lo que se considera tienen una función muy importante en la defensa contra patógenos (van Loon y Van Strien, 1999).

Por otro lado, los genes *R* conforman la base de la resistencia vertical, la cual es considerada monogénica. A pesar de lo que sugiere su nombre, los genes *R* no son directamente responsables de la resistencia, sino que actúan como receptores de las señales (proteínas Avr) originadas por el patógeno. Esto conlleva a la activación de diferentes cascadas de señales que en última instancia inician la expresión de genes responsables de los mecanismos de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

Los huertos de aguacate son afectados por múltiples enfermedades, entre las que se encuentra principalmente la llamada "tristeza del aguacatero" o "pudrición de la raíz", causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, que ataca el sistema radical de los portainjertos de los principales cultivares de aguacate como el Hass, específicamente al del aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) (Pegg *et al.*, 2002), siendo ésta una de las más importantes por las pérdidas que ocasiona. Es por ello, que el uso de portainjertos resistentes a este oomiceto se considera una de las estrategias fundamentales para el control de esta enfermedad.

Un mejor entendimiento de la expresión de los genes y como éstos inducen la respuesta de defensa en las plantas hospedantes asociadas a la interacción con oomicetos, podrá revelar detalles significativos de los mecanismos de respuesta a patógenos. Asimismo, mediante el análisis de la expresión de genes de defensa en genotipos de aguacate criollo mexicano, desafiados al ataque de *P. cinnamomi*, puede evaluarse la relación de la expresión de este tipo de genes con la resistencia a este patógeno. El objetivo de la presente investigación fue analizar la

expresión diferencial de genes de defensa reportados en genotipos de aguacate criollo mexicano, chalcona sintasa (*chs*), fenilalanina amonio liasa (*pal*), gen relacionado a patogénesis (*PR5*) y serín treonín cinasa (*stk*). Para el presente estudio se utilizaron plantas de un genotipo susceptible (AMUM-064) y un genotipo tolerante (AMUM-773), usando la técnica de qRT-PCR.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

Plantas micropropagadas de dos genotipos de aguacate criollo *mexicano* (*P. americana* var. *drymifolia*), AMUM-064 (genotipo susceptible) y AMUM-773 (genotipo tolerante), cultivadas por 12 meses en condiciones de invernadero.

### **Inoculación de zoosporas de *P. cinnamomi***

La preparación del inóculo (zoosporas) de *P. cinnamomi* fue realizada como se describe en Capítulo 2. La inoculación se hizo sobre el sistema radical de plantas de aguacate criollo mexicano de los genotipos AMUM-064 y AMUM-773 de 12 meses de edad, sumergiendo las raíces en una solución de  $2 \times 10^4$  zoosporas/mL.

La toma de muestras (raíces) se realizó con 4 réplicas (4 plantas) de ambos genotipos en estudio a las 0 (control, sin inocular), 2, 8, 24 y 48 h, después de la inoculación. Las raíces muestreadas fueron congeladas de forma inmediata en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **Extracción de ARN**

La extracción de ARN total se realizó en base al protocolo establecido por "PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen) de acuerdo al siguiente procedimiento:

El tejido vegetal se congeló con nitrógeno líquido y se pulverizó en mortero, a cada muestra de tejido molido (100 mg) se les adicionó 350  $\mu\text{L}$  de una solución buffer RLT +  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol/L) y 250  $\mu\text{L}$  etanol absoluto ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), mezclando suavemente mediante pipeteos sucesivos. Se aplicó la totalidad de la muestra (700  $\mu\text{L}$ ) a las minicolumnas, para centrifugar a 10,000 rpm por 15 segundos, eliminando el líquido para lavar la columna con 500  $\mu\text{L}$  Buffer RPE. Nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, eliminando de nuevo el líquido recolectado y agregando 500  $\mu\text{L}$  de Buffer RPE. La muestra fue centrifugada por 2 min/10,000 rpm y se secó la columna (1 min a temperatura ambiente) para posteriormente volver a centrifugar la columna 1 min/13,000 rpm. Posteriormente se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL para eluir la muestra con 20  $\mu\text{L}$  de agua-DEPC ( $65^{\circ}\text{C}$ ), centrifugando 1 min/10,000 rpm,

este paso se repitió dos veces. Finalmente, se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de muestra del eluido para determinar la concentración y la integridad del ARN, mediante separación electroforética en gel de agarosa, utilizando 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Las muestras restantes se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para evitar su degradación. Los rendimientos obtenidos fueron de un promedio de 30  $\mu\text{g}$  de ARN por mg de tejido.

### Síntesis de la primera cadena de ADNc

La primera cadena del ADNc se sintetizó a partir de 30  $\mu\text{g}$  de ARN total, cada mezcla de reacción contenía 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN total, solución de la primera cadena 10x 25mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de dNTPs, 40 unidades/mL de RNasin Inh, 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de oligo(dT), 25 unidades/mL de transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen®). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min a  $70^{\circ}\text{C}$  y de dos horas a  $42^{\circ}\text{C}$  para la síntesis de la segunda cadena.

### Oligonucleótidos

Para el análisis de la expresión de los genes de defensa se diseñaron oligonucleótidos específicos, según las necesidades del método (qRT-PCR). Estos oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa “Primer Express 3 Software (Applied Biosystems)” utilizando secuencias únicas provenientes de los genes motivo de estudio de aguacate criollo mexicano. En el cuadro 1 se muestran cada uno de los oligonucleótido.

Cuadro 1. Oligonucleótidos (cebadores) diseñados para los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk*, para el análisis de expresión por qRT-PCR.

Gen	Oligonucleótido Fw	Oligonucleótido Rv
<i>chs</i>	5'-AgCTCAAaggAgAAgTTTCAAagC-3'	5'-AAAACAAGTgggTTgATCTTgg-3'
<i>pal</i>	5'-AAAgAgATTgATgCAggAgAgg-3'	5'-TgCATTACCTCACAgAAgATgg-3'
<i>PR5</i>	5'-AACATTCCgATggACTTCTACC-3'	5'-ggCACCTATCCTTgAAgAACC-3'
<i>stk</i>	5'-ggATATTgCTAAgCgATTgAgg-3'	5'-gCTggTCTCATATCCTgATTCC-3'

## Cuantificación relativa de la expresión de genes

Los resultados de qRT-PCR se basan en la detección y cuantificación de marcadores fluorescentes (Cy3 y Cy5) a lo largo de la reacción de PCR (Walker, 2002). Para ello, es necesario determinar el valor umbral de ciclo (Ct por sus siglas en inglés), identificando el ciclo de amplificación en el cual, la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva exponencialmente durante la reacción de amplificación. Los cálculos de cuantificación relativa se obtienen comparando los valores de Ct tanto del gen en estudio como del gen de referencia cuando existe una eficiencia de la reacción de PCR cercana al 100 %. De este cálculo proviene el valor de expresión relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , mismo que sirvió para la cuantificación del transcrito después de la inoculación con *P. cinnamomi*. El control (*ACTINA2/7*) se utilizó como muestra de calibración, por lo tanto  $\Delta\Delta CT$  se obtuvo a partir de la ecuación de  $\Delta CT$  (control) -  $\Delta CT$  (de cada muestra evaluada), que representan  $\Delta CT$  [ $CT$  (uno de los genes de respuesta de defensa) \*  $E$ ] - [ $CT$  (*ACTINA2/7*) \*  $e$ ] y  $E$  es la eficiencia de la PCR estimado ( $[10^{-1/m}]^{-1}$ ). Una vez normalizados los valores de expresión con respecto al gen constitutivo *ACTINA 2/7* se graficó el comportamiento de cada gen tanto de las raíces de plantas susceptibles (AMUM-064) como de las tolerantes (AMUM-773) bajo la interacción aguacate-*P. cinnamomi*.

## Análisis de expresión por qRT-PCR

Cada reacción se realizó con 3  $\mu$ L de ADNc, 1 X de la mezcla de reacción (20  $\mu$ L) "SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)" y 500 nM de cada uno de los cebadores correspondientes a cada gen: Las condiciones de amplificación fueron: 94°C durante 10 min, 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 40 seg. Las amplificaciones de qRT-PCR se realizaron con un termociclador "7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)".

La cuantificación relativa de la abundancia de cada transcrito fue calculada y normalizada con respecto al gen constitutivo *ACTINA2/7* de las condiciones control (sin inocular), cuyos oligonucleótidos fueron diseñados considerando secuencias consenso de otras especies arbóreas. Se obtuvieron 4 réplicas independientes con un error estándar menor a 0.1 para cada una de las muestras, cada valor de expresión es el promedio de estas réplicas. Los cálculos se realizaron utilizando el programa "7500 Software v2.0.1 (Applied biosystems)" y aplicando el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001). La eficiencia de amplificación para cada juego de oligonucleótidos fue determinada realizando series de dilución (1:5) y la especificidad de los amplificadores se calculó mediante curvas de disociación, obteniendo los valores de fluorescencia entre los 65° y 95°C. En promedio, las curvas de amplificación se cuantificaron a partir del ciclo 15 de cada muestra.

## RESULTADOS

### Extracción de ARN total y obtención del ADNc

Una vez realizadas las extracciones a los diferentes tiempos de muestreo, se cuantificó el ARN total obtenido por espectrometría de fibra óptica y se determinó su integridad mediante separación electroforética en gel de agarosa. Como se observa en la figura 1, pueden apreciarse claramente las bandas correspondientes a los ARNs de las subunidades ribosomales sin presentar evidencia alguna de degradación. Lo que indicaba que las muestras cumplieron con la calidad requerida para los análisis posteriores.

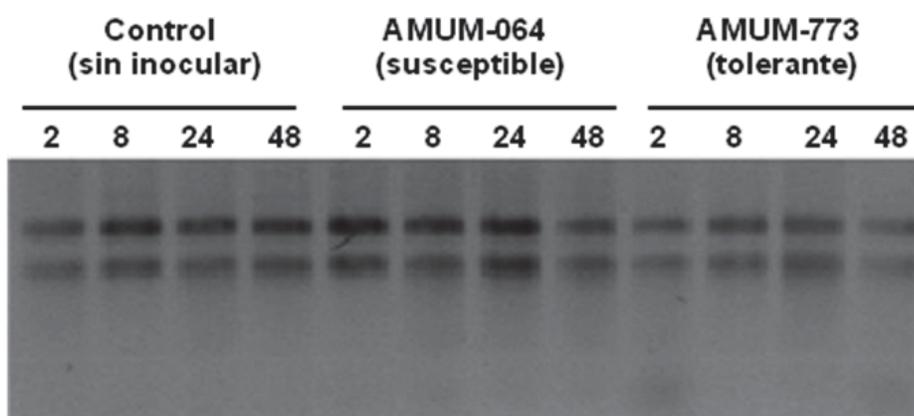


Figura 1. Electroforesis en agarosa de los ARNs extraídos que se usaron para las reacciones de qRT-PCR, en plantas de aguacate criollo mexicano sin inocular (control), en el genotipo susceptible (AMUM-064) y en el tolerante (AMUM-773), a diferentes tiempos de la inoculación de zoosporas de *P. cinnamomi*. Se cargaron aproximadamente 300 ng de ARN total de cada muestra.

### Expresión diferencial de los genes de defensa

De manera general se determinó una expresión diferencial en los genes en estudio (*chs*, *pal*, *PR5* y *stk*), encontrando valores de expresión mayores en la planta tolerante (AMUM-773) que en la susceptible (AMUM-064) (Figura 2).

En el genotipo susceptible se observó una mayor expresión de los genes *chs*, *pal* y *stk*, a las 2 h después de la infección, con valores del índice de expresión no mayores a 4.5 RQ (1.35, 3.28 y 4.34 RQ, respectivamente). El valor de expresión máxima para el gen *PR5* en la planta susceptible fue de 2.57 RQ a las 24 h (Figura 2).

Sin embargo, los valores de expresión para cada uno de los genes de defensa en estudio, fueron siempre de mayor magnitud en el genotipo tolerante: la expresión de los genes *chs* y *stk* mostraron los valores más altos a las 8 h de la infección, con un índice de expresión de 4.36 y 7.47, respectivamente; el gen *PR5* tuvo la mayor expresión a las 24 h con un valor de 6.21 RQ; y el gen *pal* mostró un aumento de la expresión a lo largo del tiempo de la infección, iniciando con 2.36 RQ a las 2 h y observando un valor de 71.46 RQ a las 48 h (Figura 2).

En la figura 3 se muestran los resultados de la expresión de cada uno de los genes en estudio, bajo una perspectiva de escala para permitir observar las diferencias entre planta susceptible y tolerante, durante la infección.

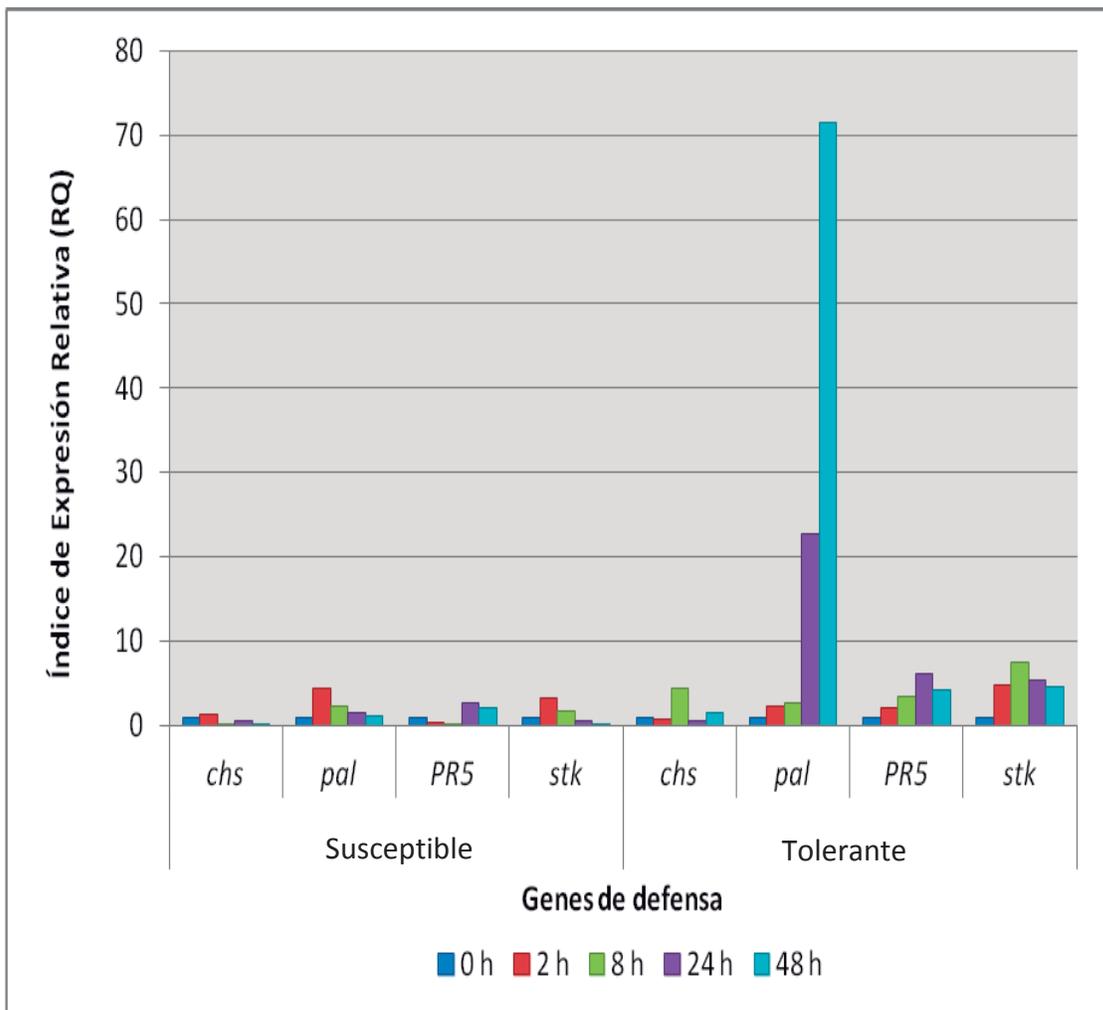


Figura 2. Índice de expresión obtenida por qRT-PCR de los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk* a las 2, 8, 24 y 48 horas después de la infección. Los niveles de expresión se muestran como RQ (número de cuantificación relativa) a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

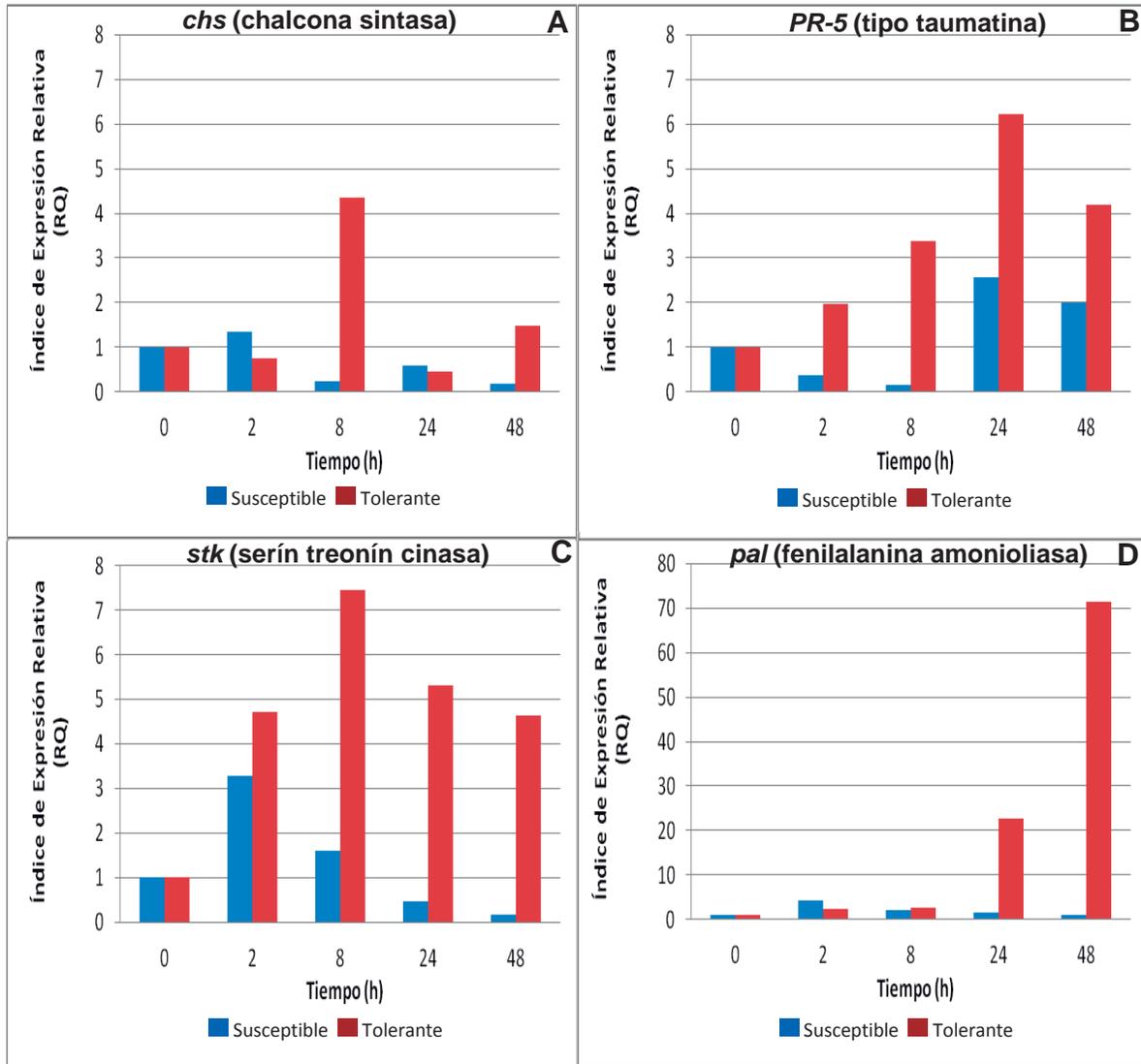


Figura 3. Índice de expresión obtenida por qRT-PCR de cada uno de los genes, A) *chs*, B) *PR5*, C) *stk* y D) *pal*, en la interacción de plantas susceptibles y tolerantes de aguacate criollo mexicano y *Phytophthora cinnamomi*, a las 2, 8, 24 y 48 horas después de la infección. Los niveles de expresión se muestran como RQ (número de cuantificación relativa) a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

El gen *chs* tuvo una mayor expresión en la planta tolerante a las 8 h de la infección (4.36 RQ), mostrando un orden de magnitud de 3.23 veces al nivel de expresión máxima en la planta susceptible, la cual presentó un valor de expresión de 1.36 RQ a las 2 h (Figura 3A).

El comportamiento de la expresión de los genes *PR5* y *stk* fue similar en el genotipo de aguacate tolerante, con un aumento en la expresión de estos genes en relación al tiempo de la infección. El gen *PR5* alcanzó su nivel más alto de expresión a las 24 h con 6.21 RQ, un valor 2.42 veces más alto que el expresado por la planta susceptible (2.57 RQ) al mismo tiempo después de la infección (Figura 3B). Para el gen *stk* el valor mayor fue de 7.46 a las 8 h después de la infección, también con una magnitud superior que el obtenido en la planta susceptible (3.38 RQ), 2.2 veces más (Figura 3C).

La expresión del gen *pal* fue la más alta observada en comparación de la expresión de los otros genes de defensa, en la planta tolerante, aumentando los valores de la expresión hasta las 24 h de la infección (22.67 RQ), 14.72 veces más que la expresión a dicho tiempo de la infección; sin embargo, la expresión mayor se presentó a las 48 h, alcanzado una valor de 71.46 RQ, produciéndose una expresión de 69.4 veces que el nivel determinado a este tiempo en la planta susceptible (Figura 3D).

Los valores de expresión génica determinados demuestran que durante la interacción aguacate-*P. cinnamomi*, la mayor expresión se da en las plantas tolerantes bajo un comportamiento de expresión diferencial.

## DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demuestran que cada uno de los genes de defensa en estudio presentó niveles de expresión mayores a los observados en la planta susceptible. La expresión del gen *chs* fue mayor 3.26 veces, la del gen *PR5* fue de 2.42 veces, la del gen *stk* de 2.2 veces y la diferencia más alta se obtuvo en la expresión del gen *pal* con 69.74 veces (Figuras 2 y 3). Estos valores concuerdan con lo reportado para otros genes de defensa, donde el aumento de la expresión se da en plantas tolerantes, principalmente a hongos (Aarts *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2000; Pflieger *et al.*, 2001) y en oomicetos (van Loon *et al.*, 2006).

En el presente estudio, los resultados proporcionaron una primera interpretación del papel de los genes de defensa en la interacción aguacate-*P. cinnamomi*, indicando que los genes *chs* y *pal*, confieren la tolerancia al genotipo AMUM-773 mediante la síntesis de metabolitos secundarios (e.g., fitoalexinas, flavonoides). Estos genes, llamados genes de defensa, conforman la base de la resistencia horizontal o poligénica y son los responsables de actuar contra el patógeno invasor (van Loon *et al.*, 2006).

Por otra parte, el gen codificante para la proteína *PR5*, cuya actividad antifúngica ha sido ampliamente demostrada en otros modelos vegetales (Pierpoint *et al.*, 1990), tuvo un incremento de al menos dos veces en la AMUM-773 en

comparación con la AMUM-O64 en tiempos tardíos después de la inoculación (24 y 48 h) (Figura 3b).

Por otro lado, la mayor expresión del gen *stk*, codificante para una cinasa, cuya función está asociada a la regulación de rutas de transducción de señales en presencia de patógenos, tuvo también los mayores valores en las plantas tolerantes al oomiceto en comparación con las plantas susceptibles (Figura 3c). Esto sugiere, que la tolerancia a *P. cinnamomi* pudiera estar determinada por la activación de estas rutas de señalización.

La expresión diferencial de los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk*, mayor en el genotipo AMUM-773 durante la infección con *P. cinnamomi*, demuestra el papel de éstos sobre la tolerancia de aguacate al oomiceto. El conocimiento y entendimiento de la expresión de los genes descritos, contribuirá al diseño de estrategias moleculares para seleccionar o generar plantas de aguacate criollo mexicano resistentes a *P. cinnamomi*.

## CONCLUSIONES

La expresión diferencial de los genes *chs*, *pal*, *PR5* y *stk*, en plantas de aguacate criollo mexicano, está directamente relacionada a la respuesta de defensa contra *P. cinnamomi*.

## LITERATURA CITADA

Aarts, M.G., Hekkert B.L., Holub E.B., Beynon J.L., Stiekema W.J. y Pereira A. 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11:251-258.

Arauz, C.F. 1998. Fitopatología, Un enfoque agroecológico. San José., Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica.

Barber, M.S. y Mitchell H.J. 1997. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *Internat. Rev. Cytol. - A Surv. Cell Biol.*, 172:243-293.

Browning, J.W. 1980. Genetic protective mechanisms of plant pathogen populations: their co- evolution and use in breeding for resistance. *In: Biology and Breeding for Resistance to Arthropods and Pathogens in Agricultural Plants* (Harris, M.K. ed.), Texas A&M University, College Station. pp. 52-75.

Collinge, D.B. Gregersen P. y Thordal-Christensen H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *In: Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches* (Basra, A.S. ed), New York, Marcel Dekker, pp. 391-433.

Cuypers, B., Schmelzer E. y Hahlbrock K. 1988. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1:157-160.

De Wit, P.J.G.M. 1997. Molecular characterization of gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopath.*, 30:391-402.

Deng, Z., Huang S., Ling P., Chen C., Yu C., Weber C.A., Moore G.A. y Gmitter F.G. Jr. 2000. Cloning and characterization of NBSLRR class resistance gene-candidate sequences in citrus. *Theor. Appl. Genet.*, 101:814–822.

Hammond-Kosack, K.E. y Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8:1773-1791.

Livak, K.J. y Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25:402-408.

Meyers, B.C., Chin D.B., Shen K.A., Sivaramakrishnan S., Lavelle D.O., Zhang Z. y Michelmore R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell*, 10:1817-1832.

Nicholson, R.L. y Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopath.*, 30:369-389.

Oerke, E.C., Dehne H.W., Sch'nbeck F. y Weber A. 1994. Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam, Netherlands, Elsevier. 808 p.

Pegg, K.G., Coates L.M., Korsten L. y Harding R.M. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. *In: Avocado: Botany, Production and Uses* (Whiley A.W., Schaffer B. y Wolstenholme B.N. eds.), CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 299-338.

Pflieger, S., Lefebvre V. y Causse M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molec. Breed.*, 7:275-291.

Pierpoint, W.S., Jackson P.J. y Evans R.M. 1990. The presence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 36:325-338.

van Loon, L.C. y Van Strien E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55:85–97.

van Loon, L.C., Rep M. y Pieterse C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann. Rev. Phytopath.*, 44:135-162.

Walker, N.J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296:557–559.

## X. DISCUSIÓN GENERAL

### 10.1. MICROPROPAGACIÓN DE GENOTIPOS DE AGUACATE CRIOLLO MEXICANO

La implementación de un método de micropropagación de tres genotipos (AMUM-064, AMUM-0765 y AMUM-773) de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) mediante la multiplicación de brotes en yemas axilares o apicales (Capítulo I), respondió a que en el banco de germoplasma donde se ubican éstos, existía solamente un árbol por genotipo. La determinación de las pruebas de tolerancia y ensayos como la expresión de genes de defensa, requería de por lo menos 10 plantas para cada experimento. De ahí la importancia que representó el lograr la micropropagación de estos genotipos en estudio.

Dos de los inconvenientes de esta técnica fueron la alta tasa de contaminación por hongos que presentan los explantes (varetas de plantas adultas) y el hecho de que dichos explantes sufren de fenómenos de oxidación fenólica. El método establecido para el cultivo *in vitro* superó tanto la contaminación como la oxidación, consiguiendo un 70% de supervivencia de explantes sin que mostraran daño por oxidación (Capítulo I).

La propagación clonal de genotipos con características deseables para la agricultura es uno de los principales logros de la micropropagación, sobre todo de aquellas plantas que presentan demasiada variabilidad genética al propagarse por semilla y que tienen dificultades para su propagación asexual por técnicas convencionales como el acodado y el enraizado de esquejes, factores que ocurren en aguacate (Pérez-Ponce, 1998; Gutiérrez, 2006).

Las plantas micropropagadas de genotipos seleccionados de aguacate criollo mexicano, con características de tolerancia no solo a *P. cinnamomi*, sino a otros

patógenos como hongos e insectos, son una alternativa para el cultivo de plantaciones de aguacate.

## **10.2. PRUEBAS DE TOLERANCIA A *P. cinnamomi***

En general, las plantas micropropagadas de los diferentes genotipos de aguacate criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) fueron útiles para probar su tolerancia mediante la infección con zoosporas de *P. cinnamomi*, dando como resultado la confirmación de la susceptibilidad del genotipo AMUM-064, una mediana tolerancia del genotipo AMUM-765 y la tolerancia del clon del genotipo AMUM-773 (Capítulo II).

Los resultados de esta investigación confirmaron la presencia de *P. cinnamomi* como agente causal de la tristeza del aguacatero y aportó las evidencias de la infección en tejido radical mediante la inoculación de zoosporas. Las plantas inoculadas, dependiendo del genotipo, desarrollaron marchitez, clorosis, necrosis foliar, respecto de los testigos sin inocular y de las plantas de genotipos no susceptibles. Los síntomas aéreos siempre estuvieron asociados con la presencia de pudrición parcial o total de las raíces, lo que eventualmente provocó la muerte de plantas.

Los altos porcentajes de supervivencia detectados en las plantas del material tolerante, permite ser optimistas en cuanto a la posibilidad de propagar masivamente plantas tolerantes a *P. cinnamomi* que puedan ser utilizadas en las plantaciones de la región aguacatera de Michoacán. Esto indica que la búsqueda de material tolerante a este patógeno debe de continuar en esta línea, realizando pruebas con un mayor número de plantas de distinta procedencia, para asegurar una tolerancia más estable. Así mismo se hace necesario utilizar diversas cepas de *P. cinnamomi* para corroborar la tolerancia de los genotipos de aguacate

Estudios similares han conducido a la selección de genotipos de plantas de valor agrícola con niveles altos de tolerancia o resistencia, ya que la micropropagación permite aumentar la tasa de multiplicación, disponer de material vegetal sano y homogéneo, adecuado para realizar pruebas de resistencia. Plantas de plátano (*Musa* spp) (Leiva-Mora, 2006), de café (*Coffea arabica*) (Amar *et al.*, 1983), de olmos (*Ulmus* spp) (García-Nieto *et al.*, 1997) y de guanábana (*Annona muricata*) (Lemos y Blake, 1996), han sido ensayadas para la selección de plantas tolerantes a microorganismos patógenos, utilizando la producción de clones por micropropagación.

### **10.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE DEFENSA**

Utilizando innovadoras herramientas de genómica funcional se ha avanzado en el entendimiento de la biología molecular en los procesos de resistencia a enfermedades y condiciones de estrés en general. Con la aplicación de estas herramientas se pueden realizar análisis globales de expresión de cientos o miles de genes bajo condiciones ambientales y fisiológicas específicas; por ejemplo la identificación de genes involucrados en las respuestas de defensa en contra de hongos u oomicetos patógenos.

En el caso particular del aguacate criollo mexicano, la aplicación de técnicas moleculares como el método de PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados con base en las secuencias de mayor homología, para amplificar regiones de ADN de genes de defensa específicos, contribuyó a la identificación de genes de defensa como *chs* (chalcona sintasa), *pal* (fenilalanina amonio liasa), *PR5* (proteína antifúngica tipo taumatina) y *stk* (serín treonín cinasa) (Capítulo III).

La presencia de estos genes determina que las plantas de aguacate criollo mexicano presentan mecanismos de defensa basales, capaces de mostrar cierto nivel de tolerancia a algunos patógenos como hongos u oomicetos. Los genes involucrados en la expresión de enzimas del metabolismo secundario vegetal,

como la chalcona sintasa (CHS) y la fenilalanina amonio liasa (PAL), han sido ampliamente reportados en diversas plantas como responsables de la tolerancia o resistencia a hongos u oomicetos. La defensa puede darse por el aumento en la síntesis de compuestos antifúngicos como fenoles, flavonoides, chalconas, flavonoles, catequinas y antocianinas, activando la expresión o la actividad de PAL y de CHS, principalmente (Bowers y Locke, 2000).

Asimismo, otro de los mecanismos es la síntesis de proteínas de defensa (PR), de las cuales las PR1, PR4 y PR5 son antifúngicas (Niderman *et al.*, 1995), la proteína PR5 es del tipo taumatina de tabaco, reportada tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Uknes *et al.*, 1992; Rebmann *et al.*, 1991). Se ha mostrado que esta proteína es análoga de osmotina en tabaco, las cuales también tienen actividad antifúngica (Woloshuk *et al.*, 1991). La sobre expresión de *PR5* de tabaco en papa, abatió los síntomas de la enfermedad producidos por *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 1994).

El gen *stk* (serín treonín cinasa) codifica para receptores de proteínas PR, teniendo la función de fosforilación de proteínas para la transducción y amplificación de señales a nivel celular, implicado en la resistencia a enfermedades. En tomate, el gen *Pto*, es el más claro ejemplo de un gen R que interactúa con un receptor tipo serín treonin cinasa para otorgar resistencia a patógenos, induciendo la expresión de genes *PR* (Thilmony *et al.*, 1995).

#### **10.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE DEFENSA**

El grado de resistencia del genotipo tolerante AMUM773 se correlacionó con los niveles de expresión de cuatro genes de defensa (*chs*, *pal*, *PR5* y *stk*) en plantas inoculadas con el oomiceto, esto es importante para determinar los componentes que podrían ser responsables de la tolerancia, ya que el valor del índice de expresión de cada uno de los cuatro genes fue mayor que en la planta susceptible

(Capítulo IV). Se dice que esta expresión fue diferencial debido a que los valores del índice de expresión varió en relación al tiempo después de la inoculación de zoosporas de *P. cinnamomi*, observándose una mayor expresión del gen *pal* a las 48 h después de la inoculación.

Son pocos los estudios encaminados a elucidar los mecanismos moleculares de la resistencia en plantas a hongos u oomicetos, sin embargo, las evidencias sugieren el papel de diversos genes *R* como un paso inicial de defensa mediante el reconocimiento del patógeno por parte de la planta en respuesta a productos de genes *Avr* elaborados por el patógeno (Parker *et al.*, 1997). Los genes *R* codifican proteínas con dominios serín treonín cinasa, que las caracteriza por localizarse en la región transmembranal (receptores), un ejemplo de éstas son las codificadas por los genes *Pto* (*Solanum lycopersicon*) y *Xa21* (*Oryza sativa*), las cuales tienen un sitio catalítico (cinasa) en la región C-terminal de la proteína, la cual se cree está involucrada en la fosforilación de proteínas durante la traducción de señales (Baker *et al.*, 1997).

En la figura 1 se esquematiza esta señalización dirigida por un gen *R* en las raíces del genotipo de aguacate criollo mexicano tolerante a *P. cinnamomi*, que pudo ocurrir en las primeras horas de la interacción (2 h), respaldado por el inicio de la expresión de *stk* a este tiempo y el mayor índice de la expresión a las 8 h (Figura 3C, Capítulo IV).

Una vez que hay actividad serín treonín cinasa durante los primeros momentos de la interacción planta-patógeno, con la fosforilación de proteínas (MAP cinasas), se desencadenan una variedad de mecanismos como las reacciones de estrés oxidativo, producción de fitoalexinas, etileno, ácido salicílico, ácido jasmónico, apoptosis, inhibidores de proteasa y proteína relacionadas a patogénesis (PR). Durante este evento, la señalización lleva a la expresión diferencial de genes de defensa como *pal*, *chs* y *PRs*, entre otros, la cual se ve aumentada en plantas que muestran tolerancia o resistencia a patógenos (Dias-Rosa *et al.*, 2010).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es la principal en la regulación de la ruta metabólica de fenilpropanoides, que cataliza la desaminación de L-fenilalanina para producir ácido *trans*-cinámico, precursor de un amplio número de metabolitos secundarios, entre ellos el ácido salicílico, una molécula señal de defensa en plantas y las fitoalexinas, compuestos con actividad antifúngica. Así mismo, la enzima chalcona sintasa (CHS) está dentro de la ruta metabólica de síntesis de fitoalexinas, fenoles y flavonoides (Sharan *et al.*, 1998). En esta investigación, Los genes de ambas enzimas, *pal* y *chs*, respectivamente, mostraron una expresión diferencial desde las primeras 8 h posterior a la infección, aunque la expresión de *pal* fue sostenida durante las 48 horas del experimento, tiempo en el cual se observó un índice elevado de expresión.

Estos índices de expresión posterior a la expresión del gen *stk* sugieren la existencia de una señalización por producto de un gen *R* que activa la expresión de los genes de defensa *pal* y *chs*, que podrían ser los responsables de aumentar la actividad de PAL y CHS para producir compuestos secundarios que detengan la infección de *P. cinnamomi* (Figura 1).

Aunado a la expresión de los genes de defensa antes mencionados, se encontró la máxima expresión del gen *PR-5*, que codifica para proteínas tipo taumatina, inducidas en tiempos tardíos de la infección (12 – 24 h) por ciertos patógenos y que presentan propiedades antifúngicas (Stintzi *et al.*, 1993). Los resultados sugieren que la expresión de este gen inicia después de encender la expresión de genes de defensa, como un mecanismo extra para detener el avance del patógeno, respuesta observada de forma general por las plantas para generar las diferentes clases de proteínas de defensa (PR) (Dias-Sosa *et al.*, 2010). El gen *PR-5* presentó su máxima expresión a las 24 h (Figura 1).

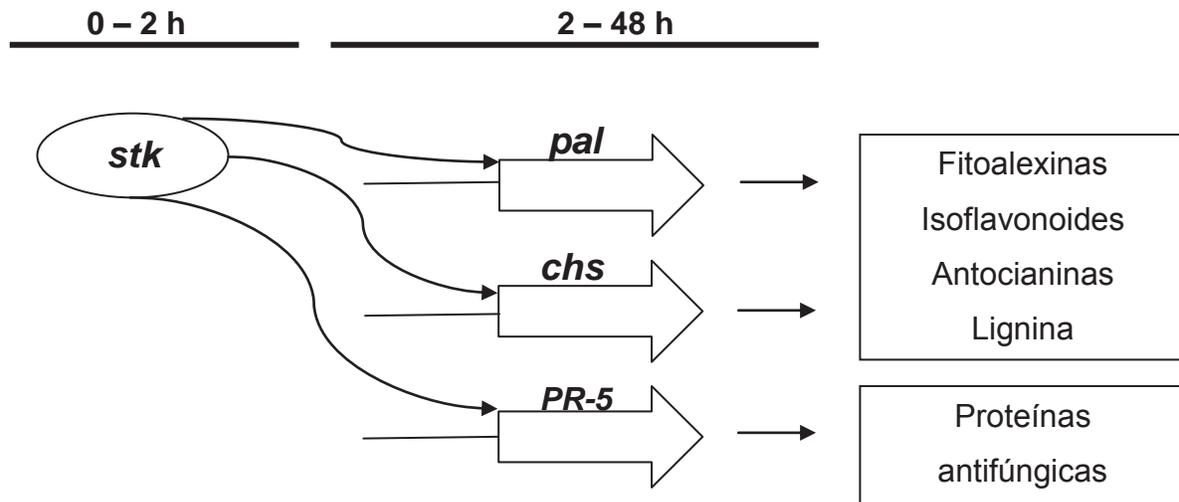


Figura 1. Representación esquemática de la inducción de la expresión diferencial de genes de defensa en la interacción *P. americana* var. *drymifolia* y *P. cinnamomi*. *chs* (chalcona sintasa), *pal* (fenilalanina amonio liasa), *PR-5* (tipo taumatina) y *stk* (serín treonín cinasa).

En el presente modelo donde se propone el mecanismo de la inducción de la expresión de genes de defensa en la interacción del genotipo tolerante de aguacate criollo mexicano con *P. cinnamomi*, se sugiere la participación tanto de genes involucrados en la resistencia específica (genes *R* o resistencia vertical) como en la resistencia no específica (genes de defensa o genes *PR* o resistencia horizontal). La tolerancia o resistencia horizontal ha sido considerada como una opción de mayor durabilidad contra diversos patógenos.

La participación de estos mecanismos de tolerancia o resistencia confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a la expresión o represión de genes cuyos productos

participan en las diferentes vías metabólicas relacionados con los mecanismos de defensa.

La comprensión de los mecanismos naturales mediante los cuales las plantas son capaces de defenderse, permite producir plantas con mayores niveles de resistencia, sin que sea necesario hacer uso de genes foráneos o extraños a la especie. A pesar de que aún queda mucho por investigar, los esquemas basados en la regulación de los mecanismos naturales de respuesta al ataque de patógenos, representa una forma más viable y duradera de producir plantas genéticamente modificadas.

Los resultados obtenidos en esta investigación, como la identificación de genes de defensa y la determinación de sus niveles de expresión en el genotipo tolerante a *P. cinnamomi*, permitirá analizar una mayor cantidad de genotipos de aguacate criollo mexicano, con fines de relacionar la tolerancia a este patógeno con la expresión de genes específicos de defensa y poder seleccionar genotipos con mejores características agronómicas.

## **XI. CONCLUSIÓN GENERAL**

La expresión diferencial de los genes de defensa *chs*, *pal*, *PR5* y *stk* en plantas de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) está relacionada con la tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*.

## XII. LITERATURA ADICIONAL

Agrios, G. 2005. Fitopatología, México, Ed. Limusa, 756 p.

Alexopoulos, C.J. y Mimms C.W. 1979. Introductory Mycology. 3ed. ed. United States of America, John Wiley and Sons, Inc. 632 p.

Amar, C., Bieysse D., Dublin P., Leguizamon C. y Muller R.A. 1983. Multiplication végétative "in vitro" des caféiers et recherche de génotypes résistants à la rouille. *In: Simposio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras (Portugal) 17-20 de Outubro 1983. p. 487-492.*

Baker, B., Zambryski P., Staskawicz B. y Dinesh-Kumar S.P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276(5313):726-733.

Baldauf, S.L., Roger A.J., Wenk-Siefert J. y Doolittle W.F. 2000. A kingdom-level phylogeny of eukariotes based on combined protein data. *Science*, 290:972-977.

Barr, D.J.S. 1992. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* 84:1-11.

Bartnicki-García, S. y Wang M.C. 1983. Biochemical aspects and morphogenesis in *Phytophthora*. *In: Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology* (Erwin D., Bartnicki-Garcia S. y Tsao P., eds.), APS, Minnesota, pp. 121-137.

Bergh, B.O. 1992. The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*. 76:61-75.

Bergh, B., y Ellstrand N. 1986. Taxonomy of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*. 70:135-145.

Bowers, J.H. y Locke J.C. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of fusarium wilt in greenhouse. *Plant Dis.*, 84:300-305.

Coffey, M.D. 1984. An integral approach to the control of avocado root rot. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, 68:61-68.

Coffey, M.D. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado – An integrated approach to control in California. *Calif. Avocado Soc. Yearbook Vol. 71: 121-137.*

Coffey, M.D. y Guillemet F.B. 1987. Avocado rootstocks. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, 71:173-179.

Dias-Rosa, D., Furtado E.L., Boava L.P., Marino C.L., Mori E.S., Guerrini I.A., Veline E.D. y Wilcken C.F. 2010. *Eucalyptus* ESTs involved in mechanisms against plant pathogens and environmental stresses. *Summa Phytopathol.*, 36(4):282-290.

Erwin, D.C. y Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul Minn. U.S.A.

Faber, B.A. y Marais L. 2001. UC IPM Pest management guidelines: Avocado diseases. University of California ANR Publication 3436. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r8100111.html>

FAOSTAT. 2005. Aguacates Superficie cultivada (Ha) - Año 2005 [http://www.fao.org/waicent/portal/statistics\\_es.asp](http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp)

García-Nieto, M.E., Gil L., Menéndez Y. e Iglesias S. 1997. Programa de mejora genética del género *Ulmus*. Cuadernos de la S.E.C.F., Reunión de Madrid, 12-13 junio 5:225-232.

Gisi, U. 1983. Biophysical aspects of the development of *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology* (Erwin D., Bartnicki-Garcia S. y Tsao P., eds.), APS, Minnesota, pp. 109-119.

Gutiérrez, L.L. 2006. Perspectivas de la biotecnología en las ecotecnologías. *Scientia Et Technica*, XII:451-456.

Hardham, A.R. 1998. Cell biology of *Phytophthora cinnamomi*. In: *Patch deaths in tropical Queensland rainforests: association and impact of *Phytophthora cinnamomi* and other soil borne pathogens* (Gadek P.A. ed.), Coop. Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management, Technical report, Cairns Australia, 98 pp.

Hardham, A.R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant Pathol.*, 6:589-604.

Ho, H. H. y Zentmyer G. A. 1977. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, 69:701-713.

Kamoun, S., Lindqvist H. y Govers F. 1999. A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8:1028-1030.

Knight, R. J. 2002. History, distribution and uses. In: *Avocado: Botany, production and uses* (Whiley A.W., Schaffer B. y Wolstenholme B.N. eds.), CABI Publishing, pp. 1-14.

Kumar, S. y A. Rzhetsky. 1996. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *J. Mol. Evol.*, 42:183-193.

Lang, B.F., Seif E., Gray M.W., O'Kelly C.J. y Burger G. 1999. A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46:320-326.

Latijnhouters, M., de Wit P.G.J.M. y Govers F. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiol.*, 11:462-469.

Leiva-Mora, M. 2006. Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa* spp. *Biotec. Veg.*, 6(3):131-147.

Lemos, E.E.P. y Blake J. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *J. Hortic. Sci.*, 71: 395-403.

Liu, D., Raghothama K.G., Hasegawa P.M. y Bressan R.A. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1888-1892.

Mengue, J. 1992. The performance of rootstocks tolerant to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* under field conditions in southern California. *Riverside, Proc. of Second World Avocado Congress*, pp. 53-59.

Niderman, T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B. y Mosinger E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 108:17-27.

Nimchuk, Z., Eulgem T., Holt B.F.I. y Dangl J.L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Ann. Rev. Genet.*, 37:579-609.

Olaeta, J.A. 2003. Industrialización del aguacate: estado actual y perspectivas futuras. *Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate)*, 749-754.

Paquin, B., Laforest M.J., Forget L., Roewer I., Wang Z., Longcore J. y Lang B.F. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.*, 31:380-395.

Parker, J.E., Coleman M.J., Szabò V., Frost L.N., Schmidt R., Van Der Biezen E.A., Moores T., Dean C., Daniels M.J. y Jones J.D.G. 1997. The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell*, 9(6):879-894.

Patterson, D.J. y Sogin M.L. 1992. Eukaryote origins and protistan diversity. *In: The origin and evolution of the cell* (Hartman H. y Matsuno K. eds.), Singapore: World Scientific, pp. 13-46.

Pegg, K.G., Coates L.M., Korsten L. y Harding R.M. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. *In: Avocado: Botany, production and uses* (Whiley A.W., Schaffer B. y Wolstenholme B.N. eds.), CABI Publishing, pp. 299-338.

Pérez-Ponce, J.N. 1998. Propagación y mejoramiento genético de plantas por biotecnología de las plantas. Cuba. pp. 13-22.

Perez, V., Huet J.C., O'Donohue M., Nespoulous C. y Pernollet J.C. 1999. A novel elicitor necrotic site revealed by  $\alpha$ -cinnamoin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochem.*, 50:961-966.

Pernollet, J.C., Sallantin M., Sallé-Tourne M. y Huet J.C. 1993. Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 42:53-67.

Rebmann, G., Mauch F. y Dudler R. 1991. Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. *Plant Mol. Biol.*, 17:283-285.

Ribeiro, O.K. , Erwin D.C. y Zentmyer G.A. 1975. An improved synthetic medium for oospore production and germination of several *Phytophthora* species. *Mycologia*, 67:1012-1019.

Ribeiro, O.K., Zentmyer G.A. y Erwin D.C. 1976. The influence of qualitative and quantitative radiation on reproduction and spore germination of four *Phytophthora* species. *Mycologia*, 68:1162-1173.

Royle, D.J. y Hickman C.J. 1964. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. *Can. J. Bot.*, 42: 311-318.

SAGARPA. 2007. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: SIACON, Sistema de Información Estadística.

Sánchez-Pérez, J. de la L. 2001. Recursos Genéticos de aguacate en México. Primer congreso mexicano y latinoamericano del aguacate. Uruapan, México. pp. 243- 250.

Sánchez Pérez, J. de la L., Alcántar Rocillo J.J., Coria Avalos V.M., Anguiano Contreras J., Vidales Fernández I., Tapia Vargas L.M., Aguilera Montañéz J.L., Hernández Ruíz G. y Vidales Fernández J.A. 2001. Tecnología para la producción

de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México, 208 pp.

Schroeder, C.A. 1990. Useful fruits of avocado relatives. Calif. Avocado Soc. Yearbook Vol. 74: 243-245.

Sharan, M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N. y Okasaki M. 1998. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science*, 132(1):13-19.

Smith, C.E. Jr. 1966. Archaeological evidence for selection in avocado. *Econ. Bot.*, 20:169-175.

Smith, C.E. Jr. 1969. Additional notes on pre-conquest avocados in Mexico. *Econ. Bot.*, 23:135-140.

Stintzi, A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M. y Fritig B. 1993. Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(3):687-706.

Storey, W.B., Bergh B. y Zentmyer G.A. 1986. The Origin, indigenous range and dissemination of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook Vol. 70 : 127-143.

Téliz, O.D. y Marroquín P.F. 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. *In: El aguacate y su manejo integrado* (2da. edición) (Téliz D. ed.), Editorial Mundi Prensa, México, pp. 3-28.

Thilmony, R.L., Chen Z., Bressan R.A. y Martin G.B. 1995. Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing *avrPto*. *Plant Cell*, 7:1529-1536.

Uknes, S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E. y Ryals J. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 4:645-656.

Vidales, F.J.A. y Alcántar R.J.J. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands) del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5:255-259.

Woloshuk, C.P., Meulenhoff J.S., Sela-Burlage M., van den Elzen P.J.M. y Cornelissen B.J.C. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 3:619-628.

Zaki, A.I., Zentmyer G.A., Sims J.J. y Keen N.T. 1983. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by oleic acid and lipids from avocado roots. *Phytopath.*, 73(2): 199-203.

Zentmyer, G.A. 1961. Avocado diseases in the Americas. *Ceiba*, 9:61-79.

Zentmyer, G.A. y Mircetich S.M. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopath.*, 56:710-712.

Zentmyer G. A. y Lewis L.N. 1976. Avocado root rot research. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, 59: 100-103.

Zentmyer, G.A. 1978. Origin of root rot resistant rootstocks. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, 62:87-89.

Zentmyer, G.A., Klure L.J. y Pond E.C. 1979. The influence of temperature and nutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, 71: 55-67.

Zentmyer, G.A. 1983. The world of *Phytophthora*. *In: Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology* (Erwin D., Bartnicki-Garcia S. y Tsao P., eds.), APS, Minnesota, pp. 1-7.

Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the disease it causes. Minnesota, APS Press. (Monograph 10), 96 p.

Zentmyer, G.A. 1985. Origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *California Avocado Society Yearbook* 69:89-94.

Zentmyer, G.A., Menge J. y Ohr H. 1994. *Phytophthora* root rot. *In: Compendium of tropical fruit disease* (Ploetz R.C., Zentmyer G.A., Nishijima W.T., Rorhbach K.G. y Ohr H.D. eds.), APS, Minnesota, pp. 77-79.

Zilberstaine, M. y Ben Ya'akov A. 1999. Integration of strategies for controlling root-rot in avocado in Israel.. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5:251-253.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Carta de aceptación de artículo.

**Marco Antonio Cortés-Rodríguez**, López-Gómez Rodolfo, Martínez-Pacheco Mauro Manuel, Suárez-Rodríguez Luis María, Hernández-García Alejandra, M. Ercelia Ángel Palomares, Ignacio Vidales Fernández and Salgado-Garciglia Rafael. 2011. ***In vitro* propagation of avocado Mexican race (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*).** *Acta Horticulturae* (En prensa).

### ANEXO 2: Secuencia en el NCBI del gen *PR5* de aguacate criollo mexicano.

**Cortes-Rodriguez, M.A.**, J. Campos-Garcia, R. Lopez-Gomez y R. Salgado-Garciglia. 2009. ***Persea americana* var. *drymifolia* PR-5 gene**, partial cds. GenBank: Accesion FJ840440.1, GI: 226440735.

### ANEXO 3. Carta de aceptación de publicación de secuencias en el NCBI de los genes *chs*, *pal* y *stk* de aguacate criollo mexicano.

Chalcona sintasa	BankIt1496313 chs JQ080915
Fenilalanina amonio liasa	BankIt1496313 pal JQ080916
Serín treonín cinasa	BankIt1496313 stk JQ080917

## **ANEXO 1.**

Fwd: acceptance of paper

Mensaje reenviado -----

De: "Eddo Rugini" <rugini@unitus.it>

Para: "Rafael Salgado Garciglia" <rsalgado@umich.mx>

Enviados: Viernes, 25 de Noviembre 2011 5:09:45

Asunto: Re: acceptance of paper

Dear

Marco Antonio Cortés Rodríguez, your paper in collaboration with other authors: "In vitro Propagation of Mexican Race Avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*)", has been accepted for publication in *Acta Horticulturae* and has been sent to the main Editor for printing.

Yours

prof Eddo Rugini co-editor

## ANEXO 2.

### Persea americana var. drymifolia PR-5 gene, partial cds

GenBank: FJ840440.1

[FASTAGraphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS FJ840440 375 bp DNA linear PLN 13-APR-2009

DEFINITION Persea americana var. drymifolia PR-5 gene, partial cds.

ACCESSION FJ840440

VERSION FJ840440.1 GI:226440735

KEYWORDS .

SOURCE Persea americana var. drymifolia

ORGANISM [Persea americana var. drymifolia](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;

Tracheophyta;

Spermatophyta; Magnoliophyta; magnoliids; Laurales;

Lauraceae;

Persea.

REFERENCE 1 (bases 1 to 375)

AUTHORS **Cortes-Rodriguez, M.A., Campos-Garcia, J., Lopez-Gomez, R. and Salgado-Garciglia, R.**

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-MAR-2009) Biotecnologia Vegetal, Universidad Michoacana De San Nicolas De Hidalgo, Edif. B3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacan 58060, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..375

/organism="Persea americana var. drymifolia"

/mol\_type="genomic DNA"

/variety="drymifolia"

/db\_xref="taxon:[580376](#)"

/note="authority: Persea americana Mill. var.

drymifolia"

[mRNA](#)

<1..>375

/product="PR-5"

[CDS](#)

<1..>375

/note="similar to Glycine max PR-5b protein; thaumatin-like protein"

/codon\_start=3

/product="PR-5"

/protein\_id="[ACO57229.1](#)"

/db\_xref="GI:226440736"

/translation="CHGRGCKTGDKGLLECQEYGGPPNTLAEYALKQYADLDWIDI

SLVDGFNIPMEFSPTSGGCKVMRCTADIKGQCPAELKADDGCNNPCTVYKTNEYCCDK

GGTCGPTPLSKFFKDRCPDAYS"

ORIGIN

```
1      gatgcatg cggggaagt tgcaagaccg gcgactgcaa gggcctgctc gagtgccaag
61     agtacggaca gccacccaac accctggccg aatacgcgct gaagcaatac gccgacctcg
121    actggattga tatatccctt gtagatggct tcaacattcc catggagtgc agccccacct
181    cagggtgggtg caaggttatg aggtgcactg ctgatataca gggccagtgt cctgcagagc
241    tcaaggcaga tgatggttgc aacaaccctc gcactgttta taaaactaat gagtattgtt
301    gcgataaagg tggtagctgt gggcccactc ctttgtctaa gttcttcaaa gacagatgcc
361    cagatgccta tagct
```

### **ANEXO 3.**

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your direct submission of sequence data to GenBank. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences:

BankIt1496313 chs JQ080915  
BankIt1496313 pal JQ080916  
BankIt1496313 stk JQ080917

We strongly recommend that these GenBank accession numbers appear in any publication that reports or discusses these data, as they give the community unique labels with which they may retrieve your data from our on-line servers.

We are now processing your submissions and will mail you copies for your review prior to their release to the public database.

You have not requested a specific release date for your sequence data. Therefore, your record(s) will be released to the public database once they are processed. If this is not what you intended, please contact us as soon as possible with the correct release date.

Please send any revisions, including bibliographic information (e.g., conversion from unpublished to published), biological data (e.g., new features), or sequence data as text in the body of an email to:

gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov

Since the flatfile record is a display format only and is not an editable format of the data, do not make changes directly to a flatfile. For complete information about different methods to update a sequence record, see: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html>

You may be interested to know that there are two GenBank submission tools available, BankIt and Sequin. BankIt is available through the World Wide Web (WWW), and Sequin, a stand-alone program, can be downloaded from NCBI's anonymous ftp site. You can access these submission tools through the NCBI Home Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

For more information about the submission process or the available submission tools, please contact GenBank User Support at [info@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:info@ncbi.nlm.nih.gov) or at (301) 496-2475.

Please reply using the original subject line. This will allow for faster processing of your correspondence.

Sincerely,

Lori Black, PhD  
The GenBank Direct Submission Staff  
Bethesda, Maryland USA