



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA DEFENSINA PaDef EN
AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*)
DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO Y EN RESPUESTA A DAÑO E
INFECCIÓN FÚNGICA**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. ROSA ISELA SALINAS ESPINOSA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ASESOR:

D.C. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ

CO-ASESOR:

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO 2018

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no habría sido posible sin el apoyo de un gran número de personas que estuvieron en mi vida durante estos más de 2 años pero principalmente quiero agradecer a mi asesor el doctor Rodolfo López Gómez ya que confió en mi aun sin conocerme dándome la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, con un proyecto que desde que se propuso me agradó y con el tiempo me fue gustando cada vez más, gracias por los consejos que me ofreció cada vez que no obtenía los resultados esperados y por las ideas que me dio para mejorar tanto mi trabajo como mis presentaciones.

A mi Co-Asesor el doctor Rafael Salgado Garciglia por las revisiones de última hora en mis presentaciones, las observaciones para mejorar mi trabajo, así como por el apoyo que me brindó en la realización de algunos experimentos.

A mis sinodales Dres. Joel Edmundo López Meza, Ernesto García Pineda y Homero Reyes de la Cruz, ya que con sus consejos después de cada presentación pude agregar más información para mejorar mi trabajo.

Al M.C. Luis María Suarez ya que durante estos 2 años respondió a mis dudas, fortaleciendo mis conocimientos y a mis compañeros de laboratorio Cinthya, Jesús, Huber y Fernando, ya que de todos aprendí un poco y me ayudaron a adaptarme rápidamente al ambiente de trabajo.

A mis compañeros y amigos de maestría Iñaki, Ismael, Xochitl, Mariana y Brian con los cuales tengo muchos momentos para recordar.

A mi familia por soportar mis momentos de ausencia ya fuera por estar en el laboratorio o estudiando.

Y a mis amigos que siempre están presentes para hacerme reír, gracias Goretti por siempre escuchar mis dramas, a Iñaki que a pesar de que tenemos años de conocernos nunca habíamos sido tan cercanos, y a Cinthya ya porque en muy poco tiempo forjamos una gran amistad.

Sé que no menciono a todas las personas que estuvieron cerca de mi durante estos más de 2 años ya que no terminaría de escribir, pero todos están en mi mente y mi corazón y les agradezco mucho su apoyo y su amistad.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico especialmente:

A Dios

Por darme salud para poder continuar con mi vida, fuerza y perseverancia para afrontar los desafíos que se presentan día a día, paciencia para soportar los momentos difíciles y sobre todo valor para afrontar nuevos retos.

A mis padres Rosa y Jesús

Por su apoyo durante todos estos años de formación académica ya que siempre me han escuchado en los momentos de desesperación y me han regalado consejos para saber sobrellevar las cosas, y con los que además he compartido momentos de tristeza y felicidad, pero más que nada agradezco el gran amor que nos han transmitido durante toda la vida a mis hermanos y a mí.

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Péptidos antimicrobianos.....	6
2.2 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos	7
2.3 Clasificación de péptidos antimicrobianos de plantas.....	10
2.4 Defensinas de plantas.....	10
2.4.1 Estructura de las defensinas	11
2.4.2 Clasificación de las defensinas	12
2.4.3 Actividad de las defensinas	13
2.5 Expresión de las defensinas de plantas	15
2.5.1 Expresión constitutiva de defensinas	15
2.5.2 Expresión inducible de defensinas bajo estrés	16
2.6 Aguacate (<i>Persea americana</i> Mill).....	21
2.7 Enfermedades del aguacate	23
2.7.1 Antracnosis.....	24
3. ANTECEDENTES.....	27
3.1 Defensina PaDef de aguacate nativo mexicano	27
3.1.1 Características generales de PaDef.....	27
3.1.2 Actividad biológica de PaDef	28
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. HIPÓTESIS.....	32
6. OBJETIVO GENERAL	33
6.1 Objetivos específicos.....	33
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
8. MATERIALES Y MÉTODOS	35
8.1 Material biológico	35

8.2 Extracción de proteínas totales.....	36
8.3 Cuantificación de proteínas totales por curva de Bradford	36
8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes ..	37
8.5 Tinción de proteínas con azul de Coomassie	38
8.6 Tinción de proteínas con nitrato de plata.....	38
8.7 Electrotransferencia de proteínas a membranas PVDF.....	39
8.8 Anticuerpo Anti-PaDef	39
8.9 Western blot con anticuerpos primarios Anti-PaDef y Anti-Actina	39
8.10 Análisis densitométrico	40
8.11 Infección de frutos con <i>C. gloeosporioides</i>	40
8.11.1 Estrés por infección fúngica.....	41
8.11.2 Estrés por daño por herida	41
8.12 Análisis de la expresión de <i>PaDef</i> por PCR semicuantitativo	42
a) Extracción de ARN	42
b) Electroforesis en gel de Agarosa	42
c) Cuantificación de ARN	42
d) Eliminación de ADN.....	43
e) Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	43
f) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final	43
g) Análisis Densitométrico	44
h) Análisis estadístico	44
9. RESULTADOS	45
9.1 Proporción de tejidos por fruto	45
9.2 Extracción de proteínas totales y electroforesis en condiciones desnaturalizantes	46
9.3 Ensayo tipo Western blot.....	46
9.4 Expresión del péptido PaDef durante el desarrollo del fruto	47
9.5 Expresión del péptido PaDef en diferentes frutos de <i>P. americana</i>	49
9.6 Expresión del péptido PaDef en tejidos de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	51
9.7 Infección de frutos de <i>P. americana</i> con <i>C. gloeosporioides</i>	52

9.8 Cinética de daño por herida en frutos de <i>P. americana</i>	55
9.9 Expresión del péptido PaDef en respuesta a estrés	56
9.10 Material adicional	58
10. DISCUSIÓN.....	61
11. CONCLUSIONES	67
12. REFERENCIAS	68

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de los PAM's en interacción con la membrana plasmática	8
Figura 2. Mecanismos de acción de los PAM's	9
Figura 3. Clasificación de las defensinas	12
Figura 4. Localización subcelular de NaD1 una defensina de tipo 2	13
Figura 5. Efecto citotóxico de la defensina NaD1 en distintas líneas celulares cancerígenas.....	14
Figura 6. Efecto de la sobreexpresión de la defensina DEF2 en el desarrollo de tomate	14
Figura 7. Análisis de la expresión órgano-específica de la defensina <i>CADEF1</i> de <i>Capsicum annuum</i> mediante Northern blot	16
Figura 8. Análisis de la expresión órgano-específica de la defensina J1 de <i>Capsicum annuum</i>	16
Figura 9. Análisis de la expresión inducible de la defensina J1-1 en <i>Capsicum annuum</i> en respuesta a infección por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> mediante Western blot	17
Figura 10. Análisis de la expresión inducible de la defensina <i>CADEF1</i> en <i>Capsicum annuum</i>	19
Figura 11. Frutos de <i>Persea americana</i>	22
Figura 12. Lesiones causadas por <i>C. gloeosporioides</i> en aguacate Hass	25
Figura 13. Cinética de infección de <i>C. gloeosporioides</i> en <i>P. americana</i> cv. Hass	26
Figura 14. Características de la defensina PaDef de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	28
Figura 15. Actividad antifúngica de PaDef contra <i>Candida spp.</i>	30
Figura 16. Porcentaje por tejido en <i>Persea americana</i>	45
Figura 17. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 13%	46
Figura 18. Ensayo tipo Western blot.....	47
Figura 19. Western Blot de muestras de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> durante la maduración del fruto.....	48

Figura 20. Expresión relativa de PaDef en <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> durante la maduración del fruto.....	49
Figura 21. Expresión de PaDef en frutos de <i>P. americana</i> en madurez de consumo	50
Figura 22. Expresión relativa de PaDef en <i>P. americana</i>	51
Figura 23. Análisis de la expresión de PaDef en plantas de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	51
Figura 24. Expresión relativa de PaDef en plantas de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	52
Figura 25. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	53
Figura 26. Cinética de infección en <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	54
Figura 27. Cinética de infección en <i>P. americana</i> cv. Hass.....	54
Figura 28. Cinética de herida en <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	55
Figura 29. Cinética de herida en <i>P. americana</i> cv. Hass	55
Figura 30. Análisis de la expresión por ensayo de Western blot de PaDef de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> en respuesta a estrés	56
Figura 31. Análisis de la expresión por ensayo de Western blot de PaDef de <i>P. americana</i> cv. Hass en respuesta a estrés	56
Figura 32. Análisis de la expresión relativa de PaDef en <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> en respuesta a estrés mediante Western blot	57
Figura 33. Análisis de la expresión relativa de PaDef en <i>P. americana</i> cv. Hass en respuesta a estrés mediante Western blot	58
Figura 34. Análisis de la expresión relativa de PaDef en mesocarpo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> en respuesta a estrés por PCR semicuantitativo	59
Figura 35. Análisis de la expresión relativa de PaDef en mesocarpo de <i>P. americana</i> cv. Hass en respuesta a estrés por PCR semicuantitativo	60

Índice de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de PAM's que interactúan con la membrana plasmática.....	8
Tabla 2. Clasificación de los PAM's de plantas.....	10
Tabla 3. Defensinas constitutivas de algunas plantas.	15
Tabla 4. Defensinas inducibles bajo estrés.....	17
Tabla 5. Patrón de expresión de las defensinas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
Tabla 6. Características entre variedades de <i>Persea americana</i>	23
Tabla 7. Genes mayormente expresados en el mesocarpo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> durante la maduración	27
Tabla 8. Efecto antibacteriano de PaDef recombinante purificado contra bacterias	29
Tabla 9. Preparación de los geles de poliacrilamida.....	37

RESUMEN

El péptido PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) está clasificado dentro de la familia de las defensinas de plantas tipo 1, ya que presenta un péptido señal de 31 aminoácidos y un dominio defensina formado por 47 aminoácidos. Este péptido tiene efecto contra bacterias Gram positivas y negativas y presenta efecto antifúngico contra algunas especies de *Candida sp.* las cuales son patógenos en humanos. Otra característica de las defensinas de plantas es su expresión constitutiva e inducible en respuesta a estrés. Ambos tipos de expresión favorecen el desarrollo de la planta ya que la protegen del ataque de patógenos, así como de diversos factores bióticos y abióticos. Además, se tienen reportes en los que las defensinas presentan efecto antifúngico contra cepas fitopatógenas, así como de su intervención en el desarrollo de tejidos de plantas lo cual hace de interés conocer su función en la planta. En este trabajo se realizó el análisis de la expresión de la defensina PaDef por ensayos tipo Western blot y PCR semicuantitativo, encontrando que el péptido se expresa de manera constitutiva durante el desarrollo y maduración del fruto, en tejidos como semilla, pulpa y cáscara de *P. americana* var. *drymifolia*. La expresión también se observó en los tejidos como raíz, tallo, hoja y flor de esta variedad de aguacate. Además, se encontró expresión del péptido en frutos de aguacate del cultivar Hass y de la variedad americana en madurez de consumo. La inducción de PaDef también fue analizada por dos tipos de estrés, por infección con *Colletotrichum gloeosporioides* y por daño por herida, encontrándose que la expresión de la defensina PaDef no se induce en respuesta a ninguno de estos tipos de estrés en pulpa tanto de aguacate nativo mexicano como del cv. Hass.

Palabras clave: Aguacate, *Colletotrichum gloeosporioides*, Herida, Péptidos Antimicrobianos.

ABSTRACT

The PaDef peptide from Mexican native avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is classified within the defensins of plants family type 1, since it has a signal peptide of 31 amino acids and a defensin domain formed by 47 amino acids. It is known that this peptide has effect against Gram positive and negative bacteria and has an antifungal effect against some species of *Candida* sp. which are pathogenic in humans. Another characteristic of plant defensins is their constitutive and inducible expression in response to stress. Both types of expression favor the development of the plant since they protect it of the attack of pathogens, as well as various biotic and abiotic factors. In addition, there are reports in which defensins have antifungal effect against phytopathogenic strains, as well as its role in the development of plant tissues, which makes it interesting to know their function in the plant. In this work, the expression of PaDef defensin was performed by Western blot assays and semiquantitative PCR. It was found that the peptide is constitutively expressed during the development, ripening and in tissues such as seed, pulp and peel of *P. americana* var. *drymifolia*. Expression was also observed in tissues such as root, stem, leaf and flower of this variety of avocado. In addition, the peptide expression was found in fruits of avocado cultivar Hass and the american variety at eating stage. Induction of PaDef was also analyzed by two types of stress, infection with *Colletotrichum gloeosporioides* and wounding, founding that the defensin PaDef expression was not induced in response to any of these kinds of stress in pulp of Mexican native avocado and the cultivar Hass.

Palabras clave: Antimicrobial peptides, Avocado, *Colletotrichum gloeosporioides*, Woundig.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa altamente especializados contra el ataque de patógenos, insectos y algunos tipos de estrés como son las heridas, sequía, salinidad, entre otros. Estos mecanismos de defensa se agrupan en dos grandes grupos, la defensa constitutiva y la defensa inducible. En la primera están involucradas las barreras estructurales y químicas preexistentes, como la pared celular, la cutícula, los estomas y los metabolitos secundarios como las fitoalexinas de diferente naturaleza química y otros como los ácidos fenólicos, polifenoles y los terpenoides, entre otros (Agrios, 2005).

La defensa inducible se origina cuando la planta percibe la presencia de un patógeno, que desencadena mecanismos moleculares que se dividen principalmente en los de inmunidad activada por PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), mediante receptores que reconocen estos patrones (PRRs, del inglés: Pattern Recognition Receptors) y que se encuentran en la superficie de las células vegetales, denominada inmunidad activada por patrones o PTI (Pattern Trigger Immunity). Sin embargo, hay patógenos que producen efectores que inhiben la PTI, los cuales son reconocidos por las plantas mediante receptores adicionales, proteína NB-LRR (del inglés: Nucleotidebinding Leucine-Rich Repeat), que desencadenan respuestas efectoras contra éstos, que constituyen la segunda forma de actuación de la inmunidad innata y se denomina ETI (del inglés: Effector Trigger Immunity), antiguamente denominada como resistencia gen por gen (Jones y Dangl 2006; Boller y He 2009).

Estos mecanismos llevan en muchos de los casos a la generación de una respuesta de muerte celular programada en los sitios de infección, denominada respuesta hipersensible (HR), la que es localizada y restringe el crecimiento y la diseminación del patógeno. La ETI como segundo frente de defensa, es capaz de percibir los efectores que inhiben la PTI a través de receptores adicionales (Cullis 2004; Boller y He 2009; Postel y Kemmerling 2009; Zipfel 2009).

Las plantas cuando detectan a los patógenos a través de la percepción de los PAMPs mediante sus PRRs situados en la superficie celular, se inducen respuestas

intracelulares asociadas a la PTI que incluyen una rápida difusión de iones a través de la membrana plasmática, la activación de la cascada de proteínas MAPK (del inglés: Mitogen-Activated Protein Kinase), la producción de especies reactivas del oxígeno, rápidos cambios en la expresión de genes y un reforzamiento de la pared celular (He *et al.* 2007; Zipfel 2008).

Los PAMP's son definidos como epítopes invariantes dentro de moléculas conservadas, indispensables para los microorganismos patógenos, ausentes en plantas y reconocidos por un gran número de hospedantes potenciales. Los PAMP's son de diversa naturaleza (péptidos, lectinas, glicanos, quitina, lipopolisacáridos, peptidoglicanos, oligosacáridos, y han sido identificados en bacterias, hongos y oomicetos) y son reconocidos por los PRRs, los que tienen gran afinidad y especificidad, capaces de reconocer un PAMP específico a concentraciones por debajo de los nanomoles (Schwessinger y Zipfel, 2008; Boller y He 2009).

Además, entre los mecanismos de defensa de las plantas, se conocen diversas moléculas de señalización relacionadas con la inducción de los genes relacionados con la defensa, entre las que se encuentran el etileno, ácido salicílico (AS), metil jasmonato (MeJA), ácido abscísico (ABA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Hong y Hwang 2002; Lee *et al.*, 2001; Penninckx *et al.*, 1996). El MeJA ha mostrado un rol crucial en la activación de la inducción de genes relacionados con la defensa en respuesta a herida y patógenos y el ABA interviene en la maduración de la semilla, su germinación y la adaptación al estrés abiótico, además de la inducción de genes relacionados con la defensa en respuesta a herida (Grant y Loake 2000; Guan *et al.*, 2000; Lamb y Dixon 1997; Orozco-Cárdenas y Ryan 1999; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). La acumulación de H_2O_2 es observada en hojas en respuesta a patógenos, herida y estrés osmótico, además según lo descrito por Orozco-Cárdenas *et al.*, (2001) es un segundo mensajero para la inducción de genes relacionados con la defensa. Mientras que el benzotiazol (BTH) y el ácido β -amino-*n*-butírico (BABA) son elicitores abióticos de la respuesta de defensa de las plantas (Gorlach *et al.*, 1996; Sunwoo *et al.*, 1996).

Entre los genes relacionados con la defensa se encuentran las proteínas relacionadas con patogénesis (PRP o Proteínas PR) entre las cuales se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs') ricos en cisteína, los que además de inducirse (durante la respuesta inmune), pueden ser constitutivos durante el desarrollo de la planta y el fruto, y se clasifican en 12 familias. Estos péptidos pueden ser clasificados de acuerdo con su conformación estructural y la ubicación de sus puentes disulfuro (de Souza *et al.* 2011).

Las defensinas y las tioninas constituyen uno de los tipos de PAM's más estudiados en plantas y pueden ser inducidas por moléculas o efectores propias de patógenos. En los últimos años se han identificado defensinas en diversas especies vegetales, las que se relacionan con la defensa inmune vegetal (Lay *et al.* 2012). Este tipo de PAM's han mostrado una diversa actividad biológica, con importancia como compuestos antibacterianos, antifúngicos, citotóxicos y efectores en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lay *et al.* 2012; Picart *et al.* 2012; Seo *et al.* 2014; Dracatos *et al.* 2016; Lacerda *et al.* 2016).

Las defensinas de plantas presentan expresión constitutiva e inducible en respuesta a la infección por patógenos, daños por herida y a estrés abiótico. Se ha mostrado que algunas de ellas se expresan durante el desarrollo de la planta (raíces, tallos, hojas y frutos) o durante procesos de infección. En frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), recientemente se identificó la defensina PaDef, que presenta tanto actividad antibacteriana como antifúngica (Guzmán-Rodríguez *et al.* 2013; Meng *et al.* 2017) pero se desconoce su función y el patrón de expresión en la planta. En la presente investigación se estudian los mecanismos de expresión de esta defensina (PaDef) en plantas y frutos de *Persea americana*, así como su expresión durante la respuesta a *Colletotrichum gloeosporioides* y daño por herida.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Péptidos antimicrobianos

Los organismos cuentan con la capacidad de sintetizar moléculas de defensa para mejorar su supervivencia, entre algunas de estas moléculas se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs), que pueden o no ser sintetizados en el ribosoma por lo cual se clasifican en NRAMPs y RAMPs, por sus siglas en inglés “Non-Ribosomally Synthesized Peptide” (Péptidos no sintetizados en el ribosoma) y “Ribosomally synthesized peptides” (péptidos sintetizados en el ribosoma) (Papagianni 2003). La síntesis de los NRAMPs es catalizada en el citosol de bacterias y hongos, y entre estos péptidos se encuentran la polimixina B, la bacitracina y la vancomicina, mientras que los RAMPs son sintetizados en los ribosomas de las células eucariotas (Grünewald y Marahiel 2006).

Se conoce un gran número de PAMs que se expresan en diversos organismos ya que estos compuestos cuentan con diversas funciones, entre las cuales destacan su actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasítica, antineoplásica, citotóxica e inmunomoduladores, además de la inhibición enzimática (Andreu y Rivas, 1998).

Los PAMs se caracterizan por ser moléculas anfipáticas mayoritariamente catiónicas las cuales presentan entre 12 y 100 aminoácidos (Zasloff 2002), por lo que su peso molecular oscila entre 2 y 10 kDa; además presenta 4, 6, 8 o 12 cisteínas conservadas, las cuales le proporcionan estabilidad estructural al péptido, así como, también se le atribuye el favorecimiento de las funciones biológicas del mismo. Los PAMs presentan estructuras variadas, las cuales dependerán de los aminoácidos presentes en su estructura, se pueden encontrar α -hélices anfipáticas e hidrofóbicas, pequeñas proteínas con estructuras secundarias como β -láminas, péptidos cíclicos y proteínas macrocíclicas (Epand *et al.*, 1999).

La expresión de algunos de estos péptidos es constitutiva, además de que se puede inducir en respuesta a distintos tipos de estrés. Herrera-Díaz *et al.*, (2016) reportan

la expresión de los péptidos antimicrobianos en bacterias, arqueas, protozoarios, hongos, plantas y animales.

2.2 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

Se han reportado diversos mecanismos de acción de los PAMs, el mayormente descrito es sobre la lisis celular causada por la despolarización de la membrana al interactuar el péptido con la membrana plasmática del patógeno. Se han descrito tres modelos conocidos como: 1, Modelo de poro toroidal; 2, Modelo de barril; y 3, Modelo de alfombra (Le *et al.*, 2017).

El modelo del poro toroidal se genera al interactuar el PAM con la membrana plasmática del patógeno, seguida de la agregación de las unidades monoméricas entrantes del péptido, haciendo que las fracciones lipídicas de las membranas interna y externa se plieguen por lo cual se genera un canal continuo revestido por algunas unidades peptídicas y la asociación de los fosfolípidos de la membrana con el péptido (**Figura 1-A**). En el modelo de barril, los monómeros peptídicos están dispuestos de forma paralela a los fosfolípidos de membrana, el lumen del canal transmembrana se reviste por la zona hidrófila de los péptidos, mientras que el lado hidrófobo se orienta hacia afuera en asociación con el núcleo lipídico de las bicapas (**Figura 1-B**). El modelo de alfombra consiste en la acumulación de los péptidos que interactúan con la membrana externa, lo que induce debilidades locales que desintegran la estructura de la membrana, dando una apariencia de alfombra como se muestra en la **Figura 1-C** (Le *et al.*, 2017).

En la **Tabla 1** se enlistan algunos PAM's que ejercen los mecanismos de acción en los cuales el péptido interactúa con la membrana plasmática, como la piscidina de *Morone saxatilis* (modelo de poro toroidal), ceratotoxina de *Ceratitis capitata* (modelo de barril) y la ovispirina de *Ovis aries* (modelo de alfombra).

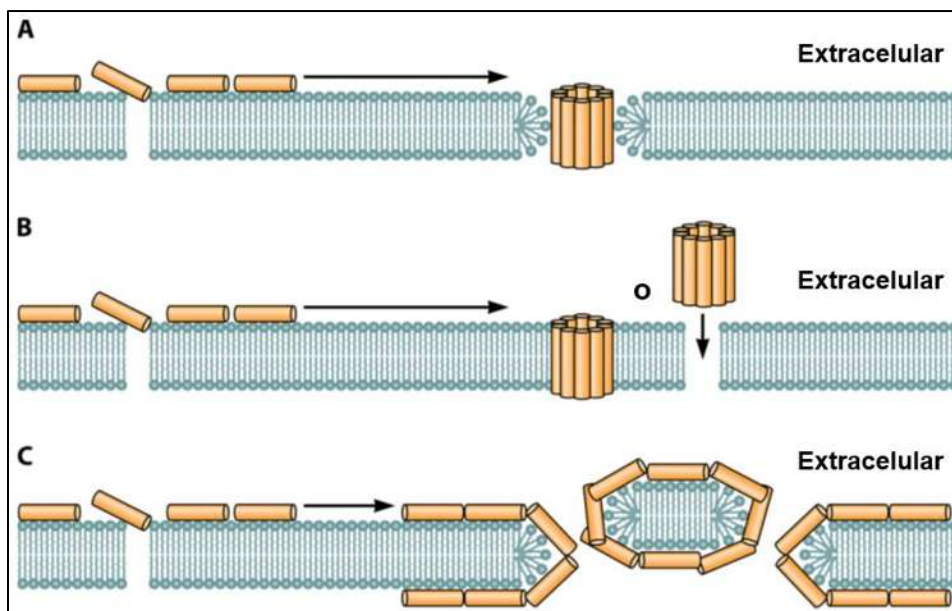


Figura 1. Mecanismo de acción de los PAM's en interacción con la membrana plasmática. **A.** Modelo de Poro toroidal, **B.** Modelo de barril y **C.** Modelo de alfombra (Le et al., 2017).

Tabla 1. Ejemplos de PAM's que interactúan con la membrana plasmática. Rahnamaeian 2011

Mecanismo de acción	Péptido	Organismo que la expresa
Modelo de Poro toroidal	Mastoparan X	<i>Vespa xanthoptera</i>
	Magainina 2	<i>Xenopus laevis</i>
	LL-37	<i>Homo sapiens</i>
	Melittin	<i>Xenopus laevis</i>
	Piscidin	<i>Morone saxatilis</i>
Modelo de barril	Pardaxina	<i>Pardarchirus marmoratus</i>
	Alamethicina	<i>Trichoderma viride</i>
	Amfotricina B	<i>Streptomyces nodosus</i>
	Ceratotoxina	<i>Ceratitis capitata</i>
Modelo de alfombra	Cecropinas	<i>Hyalophora cecropia</i>
	PGLa	<i>Xenopus laevis</i>
	Dermaseptinas	<i>Phyllomedusa spp.</i>
	Ovispirina	<i>Ovis aries</i>
	Latacinas	<i>Lachesana tarabaei</i>
	RL-37	<i>Macaca mulatta</i>

Además, los PAMs también presentan diversos mecanismos de acción los cuales se encuentran la inhibición de:

- Biosíntesis y el metabolismo del ADN

- Síntesis de proteínas (causado por el mal funcionamiento de los ribosomas)
- Plegamiento de proteínas (generado por el bloqueo de chaperonas)
- Enzimas
- División celular
- Biosíntesis de pared celular
- Péptidos de unión a lipopolisacáridos
- Respiración celular

También se induce la formación de ERO y la disrupción de la mitocondria, que afecta el flujo de ATP y NADH, así como el bloqueo de la síntesis de ARN. Estos mecanismos de acción de los PAM's se muestra de forma resumida en la **Figura 2** (Le *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2010).

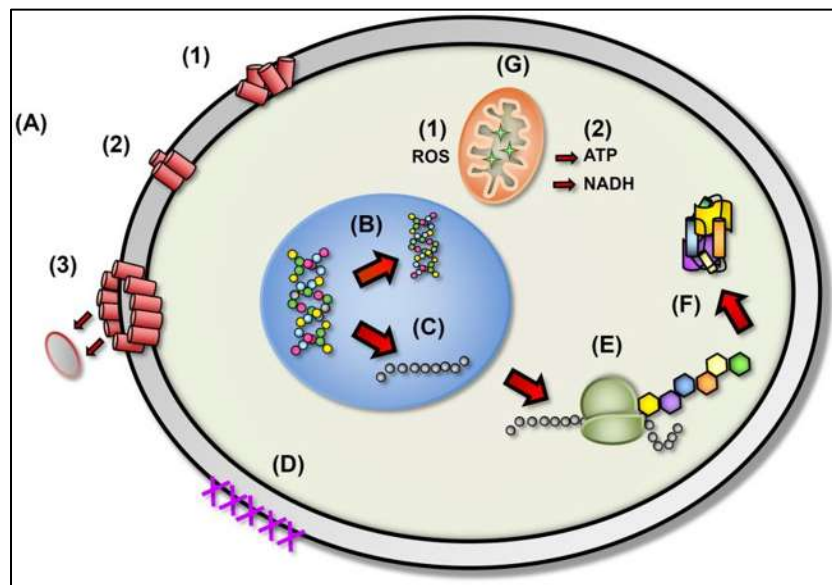


Figura 2. Mecanismos de acción de los PAM's. **A.** Interacción con la membrana plasmática (**1**, **2** y **3**), **B.** Inhibición de la síntesis de ADN, **C.** Bloqueo de la síntesis de ARN, **D.** Inhibición de enzimas necesarias para la unión de proteínas a la pared celular, **E.** Inhibición de la función de los ribosomas y la síntesis de proteínas, **F.** Bloqueo de proteínas chaperonas necesarias para el plegamiento de proteínas, **G.** Blancos en mitocondria: **1)** Inhibición de la respiración celular y la inducción de la formación de ROS y **2)** disrupción de la integridad de la membrana mitocondrial y el flujo de ATP y NADH. (Peters *et al.*, 2010)

2.3 Clasificación de péptidos antimicrobianos de plantas

Los PAM's de plantas fueron clasificados basándose en el número de aminoácidos que presenta el péptido, el número de enlaces disulfuro o cisteínas conservadas en la misma, así como en la similitud que presenta el péptido con las familias de péptidos expresados y caracterizados en otros organismos (ejemplo: mamíferos, insectos, anfibios, etc.). Los PAM's de plantas se clasificaron en 12 familias las que se muestran en la **Tabla 2** (de Souza *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 1997).

Tabla 2. Clasificación de los PAM's de plantas (de Souza *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 1997).

Familia	No. de aa. (P.M. kDa)	Enlaces disulfuro	Actividad biológica
LTP	90-95 (10)	3-4	Bacterias y Hongos
Snakina	60-70 (7)	6	Bacterias y Hongos
Defensina	45-54 (5)	4	Bacterias, Hongos y Citotóxico
Tioninas	45-47(5)	3-4	Bacterias, Hongos y Citotóxico
Tipo Heveínas	43 (5)	4	Bacterias Gram positivas y Hongos
Tipo Knottinas	36-37 (4)	3	Bacterias Gram positivas y Hongos
Shepperinas	28-38 (4)	0 (lineal)	Bacterias y Hongos
MBP-1	33 (4)	2	Bacterias y Hongos
Ciclótidos	29-31 (3)	3	Bacterias, Virus, Hongos y Citotóxico
Ib-AMP	20 (2)	2	Bacterias Gram positivas y Hongos
β -Barrelinas		6	Hongos
2S Albúminas	(4-9)	2	Bacterias y Hongos

Una de las funciones mayormente estudiadas de los PAM's de plantas es el efecto antimicrobiano, a pesar de esto, se ha encontrado que los PAM's cuentan con la capacidad de inhibir enzimas, así como, intervenir en el desarrollo de algunos tejidos de las plantas (Colilla *et al.*, 1990; Méndez *et al.*, 1990; Stotz *et al.*, 2009).

2.4 Defensinas de plantas

Las defensinas de plantas presentan un peso molecular aproximado de 5 kDa al estar conformadas por entre 45 y 54 aminoácidos, además, presentan 13 aminoácidos altamente conservados entre los cuales se encuentran las ocho

cisteínas conservadas características de este grupo de péptidos (Lacerda *et al.*, 2016), además de dos glicinas, un aminoácido aromático, un ácido glutámico y una serina (Thevissen *et al.*, 2004).

Las defensinas inicialmente fueron clasificadas como γ -tioninas debido a las similitudes estructurales con las α y β -tioninas, tanto en el peso molecular como en el número de enlaces disulfuro. Posteriormente al analizar su estructura tridimensional se encontró que las α y β -tioninas presentan 2 α -hélices y una β -lámina, mientras que las γ -tioninas cuentan con 1 α -hélices y 3 láminas β . Al realizarse análisis estructurales se encontró una mayor similitud de estos péptidos con las defensinas de insectos y herbívoros por lo cual se los clasifico como defensinas (Cornet *et al.*, 1995).

Un ejemplo de esto son las primeras defensinas aisladas a partir de endospermo de trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) (Colilla *et al.*, 1990; Méndez *et al.*, 1990). Estos péptidos presentan un peso molecular de entre 5.15 y 5.25 kDa, además de presentar 47 aminoácidos, de los cuales 8 son cisteínas conservadas dentro de las familias de péptidos antimicrobianos. A pesar de que estos péptidos presentaban 8 cisteínas conservadas, se encontró que la ubicación de éstas era distinta a las de las presentadas en las α y β tioninas, ya que esta familia de PAM's presentan las cisteínas muy cercanas al extremo C-terminal, mientras que las cisteínas de las γ -tioninas aisladas de trigo y cebada, se ubican a lo largo de la estructura lo que confiere una estructura tridimensional distinta por lo cual fueron reclasificadas a la familia de las defensinas.

2.4.1 Estructura de las defensinas

Según lo descrito por Cornet *et al.*, (1995), Goyal y Mattoo, (2016) y Lay y Anderson, (2005) la estructura tridimensional de estos péptidos está formada por una α -hélice y tres β -láminas antiparalelas, que están ordenadas en una configuración $\beta\alpha\beta\beta$, también conocida como motivo $\alpha\beta$ estabilizado por cisteínas (motivo CS $\alpha\beta$). Hasta el 2002 se conocían solo defensinas monoméricas, pero en ese año, Melo *et al.*, (2002) y Song *et al.*, (2005) encontraron que las defensinas Cp-tionina (Cowpea thionin) de *Vigna unguiculata* y SPE10 de *Pachyrhizus erosus* fueron capaces de

formar dímeros. Lay *et al.*, (2012) encontraron que la defensina NaD1 de *Nicotiana glauca* a altas concentraciones, estaba formada por dímeros, trímeros y tetrámeros.

2.4.2 Clasificación de las defensinas

Las defensinas de plantas también presentan una clasificación basada en la estructura del prepéptido, siendo las defensinas del tipo 1 las que presentan un péptido señal de entre 27 y 33 aminoácidos, que se encuentra unido al extremo N-terminal del dominio defensina, mientras que, las defensinas del tipo 2 presentan además un prodominio C-terminal, con un número de aminoácidos similar al presente en el péptido señal (**Figura 3**) (Lay y Anderson, 2005).

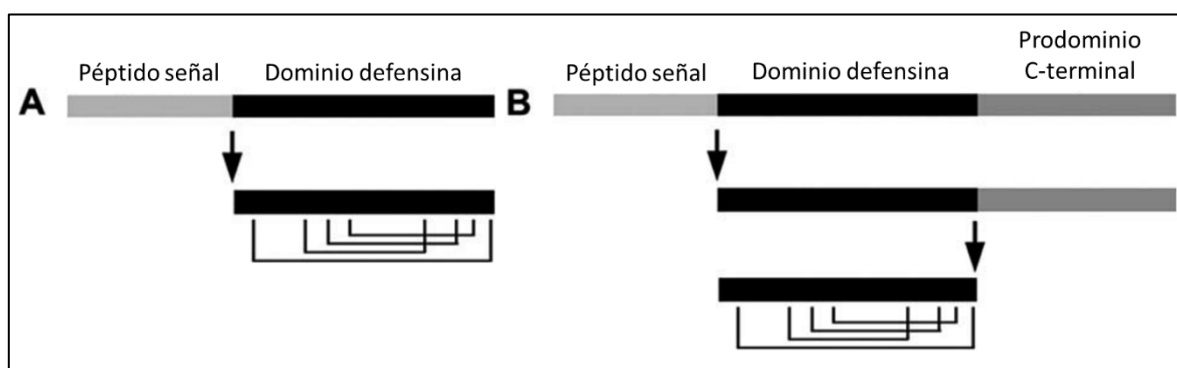


Figura 3. Clasificación de las defensinas. **A.** Defensinas tipo 1 y **B.** Defensinas tipo 2.

Se sabe que la ubicación subcelular depende del tipo de defensina, siendo las defensinas del tipo 1 las encontradas en el apoplasto como es la defensina Rs-AFP1 de *Raphanus sativus*, mientras que las defensinas del tipo 2 se encuentran asociadas a la vacuola como es el caso de la defensina NaD1 de *Nicotiana glauca* (Lay *et al.*, 2014) (**Figura 4**). Las diferencias encontradas en las ubicaciones subcelulares son atribuidas al péptido señal (transporta el prepéptido al apoplasto) y el prodominio C-terminal (asocia el prepéptido a la vacuola).

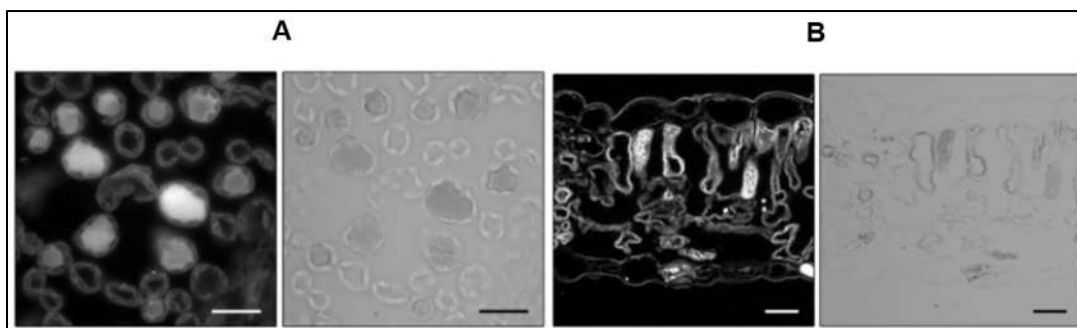


Figura 4. Localización subcelular de NaD1 una defensina de tipo 2. **A.** Inmunolocalización de la defensina NaD1 en las vacuolas de los mesófilos de plantas transgénicas de *Gossypium hirsutum* L. cv. Coker (Con C-terminal). **B.** Inmunolocalización de la defensina NaD1 en la periferia de la célula de plantas transgénicas de *Gossypium hirsutum* L. cv. Coker (Péptido maduro).

Es importante resaltar que el prepéptido no cuenta con actividad biológica, para activarse es necesario que, por medio de proteasas, el dominio defensina sea liberado en su sitio de acción. Para las defensinas de tipo 2, las proteasas eliminan inicialmente el prodominio C-Terminal, lo que permite que el péptido señal ejerza su acción y posteriormente llegue a su sitio de acción. Otras proteasas desprenden el péptido señal permitiendo al dominio defensina ejercer su efecto.

2.4.3 Actividad de las defensinas

Las defensinas de plantas presentan variadas actividades entre las cuales se encuentran el efecto antibacteriano y el antifúngico, también puede inhibir el efecto de algunas enzimas como la α -amilasa. Otro efecto de las defensinas ampliamente estudiado es el citotóxico, así como el efecto producido durante el desarrollo de las plantas.

Entre las defensinas con efecto antifúngico se encuentran: PgD5 de *Picea glauca* (Picart *et al.*, 2012), la defensina NaD1 de *Nicotiana glauca* (Dracatos *et al.*, 2016; Lay *et al.*, 2012), la DRR230-a de *Pisum sativum* (Lacerda *et al.*, 2016), la J1-1 de *Capsicum annuum* (Seo *et al.*, 2014). Dentro de las defensinas que inhiben el efecto de la α -amilasa se encuentran la γ -hordotionina de *Triticum aestivum* y la γ -purotionina de *Hordeum vulgare*, y la defensina de *Sorghum bicolor* (Bloch y Richardson 1991; Colilla *et al.*, 1990; Méndez *et al.*, 1990).

Entre las defensinas con efecto citotóxico se encuentra la defensina NaD1 de *Nicotiana alata*, que como se muestra en la **Figura 5**, reduce el porcentaje de células viables de las líneas celulares cancerígenas analizadas (Baxter *et al.*, 2017).

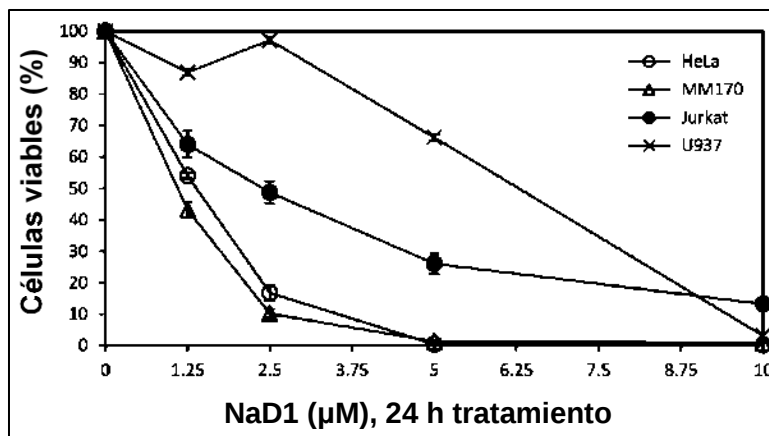


Figura 5. Efecto citotóxico de la defensina NaD1 en distintas líneas celulares cancerígenas (Baxter *et al.*, 2017).

Así mismo, Stotz *et al.*, (2009) encontraron que el crecimiento de las plántulas de plantas transgénicas de *Solanum lycopersicon* cv. VF36 y cv. Zhongshu 5, a etapas tempranas se ve disminuido, ya que sobreexpresan la defensina DEF2, además de reducir la viabilidad del polen como se observa en la **Figura 6**.

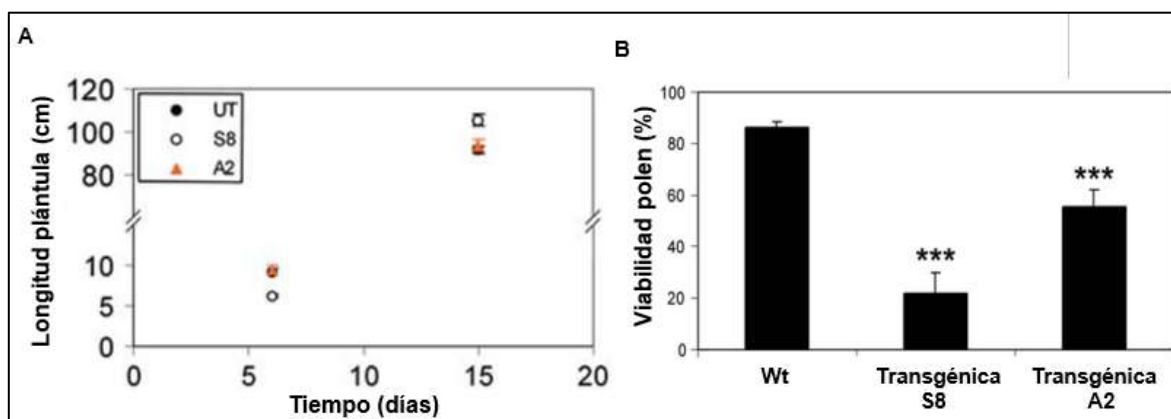


Figura 6. Efecto de la sobreexpresión de la defensina DEF2 en el desarrollo de plántulas de tomate (**A**). Efecto de la sobreexpresión de la defensina DEF2 en la viabilidad de polen de jitomate (**B**) (Stotz *et al.*, 2009).

2.5 Expresión de las defensinas de plantas

2.5.1 Expresión constitutiva de defensinas

Como se mencionó anteriormente los PAM's cuentan con la capacidad de expresarse de forma constitutiva en diversos tejidos, lo cual protege a la planta del ataque de patógenos y de factores ambientales, que pueden disminuir la supervivencia de la planta.

Así mismo, las defensinas se pueden expresar durante el desarrollo y maduración de los frutos, lo cual las previene igualmente del ataque de patógenos, mejorando la integridad del fruto y favoreciendo la maduración de la semilla (Meneguetti *et al.*, 2017). Algunas defensinas de expresión constitutiva, así como órgano específicas se enlistan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Defensinas constitutivas de algunas plantas.

Defensina	Planta	Órgano	Referencia
<i>CDef1</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Fruto (Madurez fisiológica a completa 0-100%)	Maarof <i>et al.</i> , 2011
<i>NbDef1.1</i> , <i>1.2</i> , <i>1.3</i> , <i>1.4</i> , <i>1.5</i> , <i>1.6</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Raíz, tallo, hojas y flores	Bahramneja <i>et al.</i> , 2009
<i>NbDef2.1</i> y <i>2.2</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Flores	Bahramnejad <i>et al.</i> , 2009
<i>Hc-AFP1</i>	<i>Heliophila coronifolia</i>	Tallos, hojas, flores, silicuas y semillas	De Beer y Vivier, 2011
<i>Hc-AFP2</i> y <i>4</i>	<i>Heliophila coronifolia</i>	Silicuas y semillas	De Beer y Vivier, 2011
<i>Hc-AFP3</i>	<i>Heliophila coronifolia</i>	Tallos, hojas, flores y silicuas	De Beer y Vivier, 2011

Otro ejemplo de defensina de expresión constitutiva es la defensina *CADEF1* de *Capsicum annuum* cv. Hanbyul, la cual, según lo encontrado por Do *et al.*, (2004) muestra distintos niveles de expresión en tallo, raíz y fruto verde, mientras que no se encontró la presencia del transcrito en hojas, flores y frutos rojos, demostrando la órgano especificidad de este péptido (**Figura 7**).

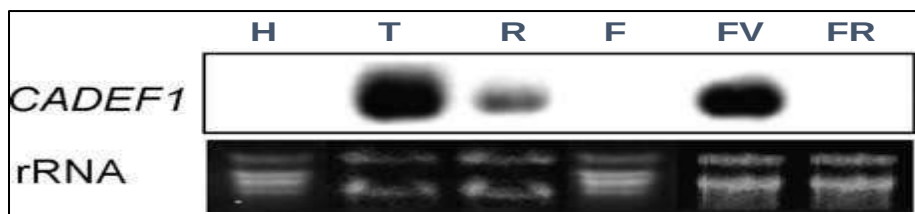


Figura 7. Análisis de la expresión órgano-específica de la defensina *CADEF1* de *Capsicum annuum* mediante Northern blot. Tejidos analizados: **H:** Hoja, **T:** Tallo, **R:** Raíz, **F:** Flor, **FV:** Fruto verde y **FR:** Fruto rojo.

Además, el transcrito de la defensina *J1* de *Capsicum annuum* var. Yolo Wonder se encuentra presente en fruto naranja y frutos rojos, mientras que el transcrito no se presenta en hojas y fruto verde (**Figura 8-A**), posteriormente se realizó una inmunodetección en los mismos tejidos, encontrándose la presencia del péptido J1 en frutos rojos como se observa en la **Figura 8-B** (Meyer *et al.*, 1995).

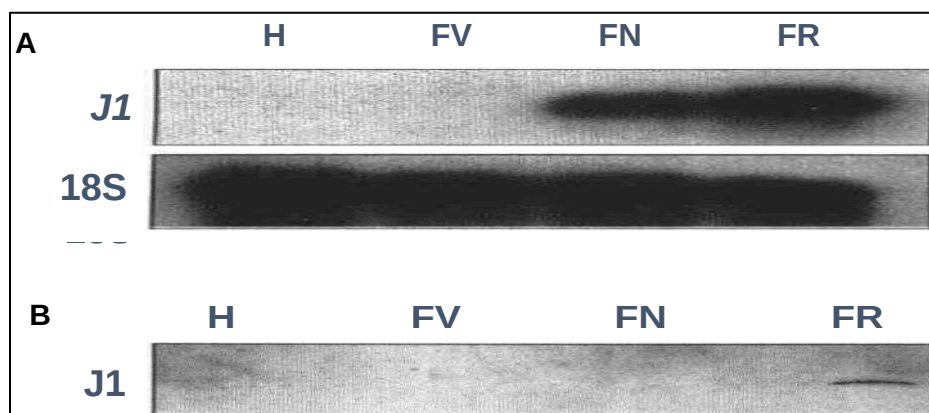


Figura 8. Análisis de la expresión órgano-específica de la defensina *J1* de *Capsicum annuum* mediante Northern blot (**A**). Análisis de la expresión órgano-específica de la defensina *J1* de *Capsicum annuum* mediante Western blot (**B**). Tejidos analizados: **H:** Hoja, **FV:** Fruto verde, **FN:** Fruto naranja y **FR:** Fruto rojo.

2.5.2 Expresión inducible de defensinas bajo estrés

Algunas plantas, además, cuentan con la capacidad de inducir la expresión de defensinas en respuesta a algunos tipos de estrés como son la infección por patógenos, daños por herida, salinidad, sequia, bajas y altas temperaturas, entre otros. Existen diversos estudios que demuestran la inducción de algunas defensinas de plantas en respuesta a estrés las cuales se encuentran enlistadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Defensinas inducibles bajo estrés (Lay y Anderson, 2005).

Estrés	Defensina	Planta	Órgano
Infección por patógenos	DRR230-a, DRR230-b	<i>Pisum sativum</i>	Vainas
	Rs-AFP3, Rs-AFP4	<i>Raphanus sativus</i>	Hojas
	DRR230-c	<i>Pisum sativum</i>	Hojas
	PDF1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas
	PDF1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas
	FST	<i>Nicotiana tabacum</i>	Sépalos
Herida	DRR230-c	<i>Pisum sativum</i>	Hojas
Sequia	Dhn8	<i>Glycine max</i>	Hojas y raíces
Salinidad	NeThio1, NeThio2	<i>Nicotiana excelsior</i>	Hojas
	Np-Thio1	<i>Nicotiana paniculata</i>	Hojas
Frío	Tad1	<i>Triticum aestivum</i>	Plántulas

Entre otros ejemplos se encuentra la defensina J1-1 de *Capsicum annuum* cv. Nokkwang, constitutiva en fruto maduro, así mismo, se puede inducir en respuesta a infección por el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, que genera antracnosis en fruto inmaduro y maduro, por lo cual fue de interés conocer la expresión de este péptido durante la infección. Con este hongo fueron infectados tanto frutos inmaduros como maduros, encontrando que en el fruto inmaduro no se presenta la inducción del péptido, mientras que en el fruto maduro se observa un aumento en la expresión del mismo, durante los tiempos analizados (**Figura 9**) (Seo *et al.*, 2014).

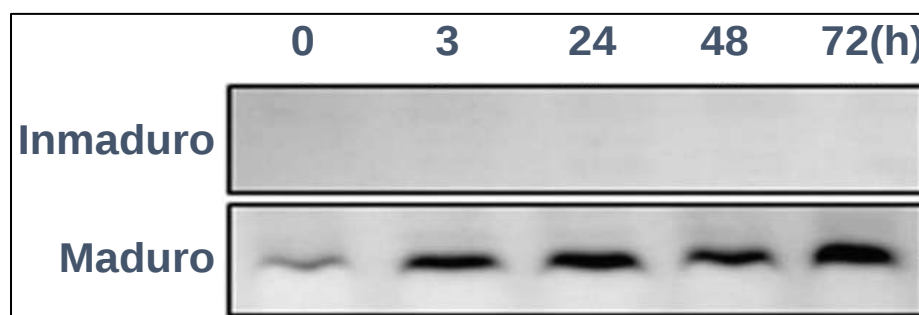


Figura 9. Análisis de la expresión inducible de la defensina J1-1 en *Capsicum annuum* en respuesta a infección por *Colletotrichum gloeosporioides* mediante Western blot. Tejidos analizados: Fruto Inmaduro y Fruto maduro.

Al igual que las anteriores defensinas, se han realizado estudios con el fin de determinar el patrón de expresión con la inducción por distintos tipos de estrés como en respuesta a infecciones, herida y algunos elicitores abióticos. Do *et al.*, (2004)

sometieron hojas de *Capsicum annuum* cv. Hanbyul a diversos tipos de estrés, inicialmente a la infección con la bacteria *Xanthomonas campestris* cepas Ds-1 y Bv4-5a, virulenta y avirulenta, respectivamente. Con el análisis del transcrito por medio de Northern blot se observó que el gen *CADEF1* en las hojas control no presentaron expresión, mientras que al producirse la infección se pudieron observar dos comportamientos distintos: el primero fue el observado en la infección compatible, generada con la cepa virulenta, presentándose una inducción del péptido a partir de las dos horas posteriores a la inoculación del patógeno, y un aumento durante los tiempos analizados como se muestra en la **Figura 10-A**; el segundo comportamiento se observó en la infección incompatible (cepa avirulenta), presentándose una mayor inducción del transcrito a las dos horas posteriores a la inoculación, en comparación con la infección compatible, pero a partir de las 18 horas no se observó la presencia del transcrito, debido a la necrosis del tejido causada por una reacción hipersensible.

También se analizó la expresión de este gen en respuesta a herida, al igual que en el análisis anterior, se usaron hojas de *Capsicum annuum*, observando que en la muestra control no se mostró la presencia del transcrito, mientras que, en las hojas con daño mecánico, la inducción de la defensina se presentó a partir de los 30 minutos posteriores al daño y un aumento de la expresión durante los tiempos analizados (**Figura 10-B**).

Al exponer plantas a inductores abióticos se encontró que como se muestra en la **Figura 10-C**, el gen se induce ampliamente en hojas de *Capsicum annuum* tratadas con ácido salicílico, metil jasmonato, ácido butírico, peróxido de hidrógeno y ácido abscísico, y en mucho menor proporción se induce en respuesta a benzotiazol, mientras que las hojas expuestas a etileno no presentaron la expresión del gen *CADEF1*.

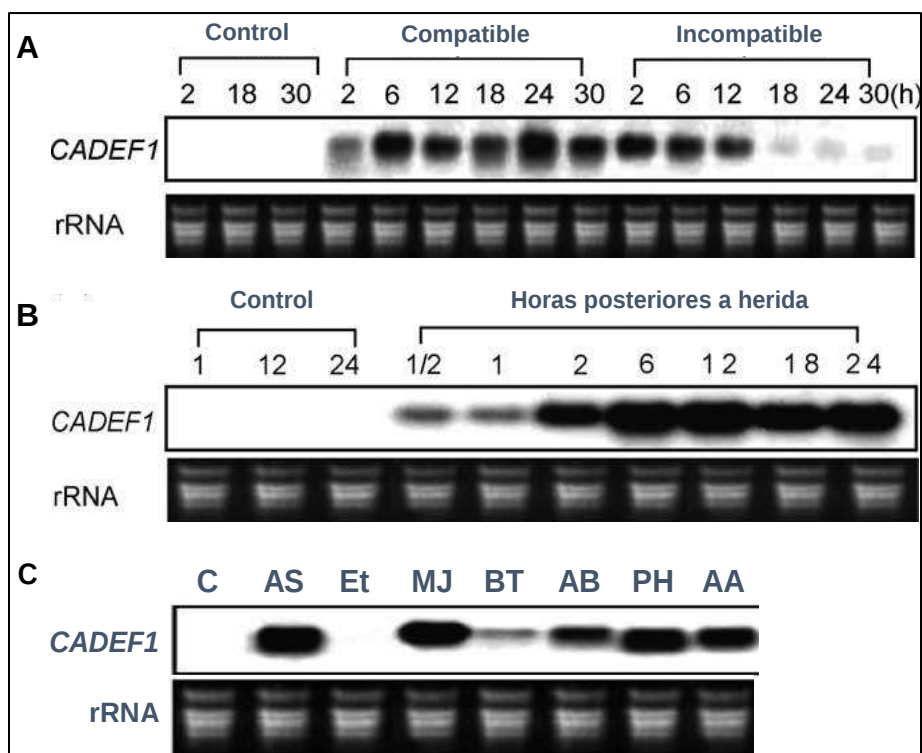


Figura 10. Análisis de la expresión inducible de la defensina *CADEF1* en *Capsicum annuum* en respuesta a infección por *Xanthomonas campestris* cepas Ds-1 y Bv4-5a (virulenta y avirulenta) (**A**). Análisis de la expresión inducible de la defensina *CADEF1* en *Capsicum annuum* en respuesta a daño por herida (**B**). Análisis de la expresión inducible de la defensina *CADEF1* en *Capsicum annuum* en respuesta a elicitores abióticos (**C**). Tratamientos analizados en hojas: **C**: Control, **AS**: Ácido salicílico, **Et**: Etileno, **MJ**: Metil jasmonato, **BT**: Benzotiazol, **AB**: Ácido butírico, **PH**: Peróxido de hidrógeno y **AA**: Ácido abscísico.

Otras defensinas analizadas bajo diversos tipos de estrés son las defensinas de *Nicotiana benthamiana*, la cual expresa ocho defensinas, seis pertenecen a las defensinas de tipo 1 (*NbDef1.1* a *1.6*) y las dos defensinas restantes se clasifican dentro de las defensinas de tipo 2 (*NbDef2.1* y *2.2*). Las defensinas de tipo 1 presentan una expresión constitutiva en raíz, tallo, hojas, flores y semillas, mientras que las defensinas de tipo 2 son expresadas únicamente en flores. Las plantas fueron sometidas a distintos tipos de estrés entre los que se encontraron la infección fúngica, infección bacteriana compatible e incompatible, herida, etileno y benzotiazol para conocer si alguna de las defensinas se puede inducir (Bahramnejad *et al.*, 2009).

Las plantas sometidas a infección fúngica fueron inoculadas con *Colletotrichum destructivum* y *Colletotrichum orbiculare* (generaron necrosis a las 60 y 72 horas posteriores a la inoculación, respectivamente). En la infección bacteriana compatible las plantas fueron inoculadas con la bacteria hemibiótrofa *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (generó necrosis a las 72 horas después de la inoculación). En la infección incompatible se utilizó la cepa hemibiótrofa de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (avrPto) (se observó cambio en la dureza y flexibilidad a las 12 horas posteriores a la inoculación, mientras que entre las 15 y 18 horas posteriores a la inoculación se generó la necrosis del tejido).

Se encontró que las defensinas *NbDef1.1* y *NbDef1.4* se inducen en respuesta a infección incompatible, herida, etileno y BTH, la defensina *NbDef1.2* en respuesta a la necrosis generada en la infección compatible, en infección incompatible, así como herida. La defensina *NbDef1.3* se induce únicamente en respuesta a BTH, así como la defensina *NbDef1.6* se induce al tratarla con etileno. La defensina *NbDef2.2* se indujo en respuesta a la necrosis generada durante la infección compatible, en infección incompatible, herida, etileno y BTH. Por otro lado, el transcrito de las defensinas *NbDef1.5* y *NbDef2.1* no se detectó en los tratamientos analizados. También se encontró que las defensinas *NbDef1.1*, *NbDef1.3*, *NbDef1.4* y *NbDef1.6* presentan una disminución en su expresión a tiempos tardíos (48 horas posteriores a la inoculación del patógeno). Estos datos se resumen en la **Tabla 5** (Bahramnejad *et al.*, 2009).

Estos resultados muestran que algunas defensinas se inducen solo bajo algunos tipos de estrés, así mismo se puede generar la inducción en respuesta a la necrosis del tejido causada por algunos patógenos lo que indica una probable especificidad.

Tabla 5. Patrón de expresión de las defensinas de *Nicotiana benthamiana* (Bahramnejad *et al.*, 2009).

	C. destructivum, C. orbiculare	P. syringae	P. syringae (avrPto)	Herida	Etileno	BTH
NbDef1.1	S.C.	↓ (48HPT)	↑ (3HPT), ↓	↑ (3HPT)	↑	↑
NbDef1.2	S.C.	↑ (72HPT)	↑ (3HPT), ↓	↑ (3HPT)	S.C.	S.C.
NbDef1.3	S.C.	↓ (48HPT)	S.C.	S.C.	S.C.	↑ (24HPT), ↓
NbDef1.4	S.C.	↓ (48HPT)	↑ (3HPT), ↓	↑ (3HPT)	↑	↑
NbDef1.5	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.
NbDef1.6	S.C.	↓ (48HPT)	S.C.	S.C.	↑	S.C.
NbDef2.1	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.
NbDef2.2	S.D.	↑ (72HPT)	↑ (12HPT), ↓	↑ (3HPT)	↑ (6HPT), ↓	↑

S.C.: Sin Cambios significativos, **S.D.:** Sin Detección del transcrito, ↑: Aumento en la expresión, ↓: Disminución en la expresión, **HPT:** Horas Posteriores a Tratamiento.

2.6 Aguacate (*Persea americana* Mill)

El aguacate (*Persea americana* Mill) pertenece a la familia Lauraceae que se caracterizan por ser árboles de gran tamaño, que producen frutos de diversos tamaños y formas. Se han clasificado tres variedades botánicas de aguacate: *Persea americana* var. americana (aguacate antillano), *Persea americana* var. guatemalensis (aguacate guatemalteco) y *Persea americana* var. drymifolia (aguacate criollo o nativo mexicano), cuyos frutos se muestran en la **Figura 11**.



Figura 11. Frutos de *Persea americana*. *Persea americana* var. *americana*, var. *guatemalensis* y var. *drymifolia* lo cuales se observan de izquierda a derecha.

Cada variedad presenta diferencias entre las cuales se encuentran: el clima de crecimiento de los árboles, las altitudes en que se desarrolla, así como características específicas del fruto. *Persea americana* var. *americana* se desarrolla en la zona de las Antillas, *Persea americana* var. *guatemalensis* en la zona sur de México y en Centroamérica, mientras que *Persea americana* var. *drymifolia* se desarrolla en la zona centro y oeste de nuestro país. Las principales diferencias entre sus frutos se describen en la **Tabla 6**. Una característica más de *Persea americana* var. *drymifolia* es un distintivo aroma anisado en las hojas el cual no se presenta en las otras variedades.

Los frutos de la variedad comercial *Persea americana* cv. Hass presentan una mayor importancia económica en el país debido a que las características del fruto favorecen el almacenamiento y transporte. Lo que beneficia su exportación a nivel mundial. Entre algunas características de este cultivar se encuentran el tamaño del fruto, una cáscara gruesa y rugosa además que el tiempo de maduración es más extendido que en las variedades de *P. americana*. A pesar de todo lo anterior, es de interés el estudio de las variedades de *P. americana*, ya que las variedades de esta especie sirven como portainjerto para un gran número de cultivares.

Tabla 6. Características entre variedades de *Persea americana* (Barrientos y López, 1998).

Característica		<i>Persea americana</i> var. americana	<i>Persea americana</i> var. guatemalensis	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
Clima		Tropical	Subtropical	Semitropical a Frío
Altitud		Menos de 1,000 m.s.n.m.	1,000-2,000 m.s.n.m.	Mas de 2,000 m.s.n.m.
Fruto	Tamaño y forma	Grande en forma de pera.	Pequeño y redondo.	Pequeño a grande, presenta diversas formas.
	Cáscara	Delgada y lisa, color verde al madurar, se desprende fácil de la pulpa.	Gruesa y rugosa, color negro al madurar, se desprende fácil de la pulpa.	Delgada y lisa, color negro-morado al madurar, no se desprende de la pulpa.
	Semilla	Pequeña, desprendida de la pulpa con cotiledones rugosos	Pequeña, adherida a la pulpa con cotiledones lisos.	Grande, adherida o desprendida de la pulpa con cotiledones lisos o rugosos.
	Tiempo de desarrollo	Entre 5 y 9 meses a partir de antesis.	Entre 10 y 16 meses a partir de antesis.	Entre 6 y 9 meses a partir de antesis.

2.7 Enfermedades del aguacate

Las tres variedades de aguacate, así como, los cultivares pueden presentar enfermedades comunes, entre las cuales destaca la antracnosis causada por diversas especies del hongo patógeno *Colletotrichum*, que genera daños en tallos,

hojas, flores y frutos. La antracnosis es una de las enfermedades más importantes del fruto de aguacate en la etapa de postcosecha (Nelson, 2008).

2.7.1 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad que se puede presentar en frutos que se desarrollan en zonas de clima tropical. Entre los frutos que pueden presentar esta enfermedad se encuentran el aguacate, el jitomate, la zarzamora, la fresa, el mango, la papaya, entre otros. La antracnosis es causada por diversas especies del patógeno *Colletotrichum* como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Colletotrichum acutatum*, por mencionar algunos (Nelson, 2008; Vidales *et al.*, 2005).

Colletotrichum se caracteriza por ser un hongo hemibiótrofo, que puede infectar por medio de germinación de esporas, formación de apresorios y penetración. En particular, el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* en medio PDA se caracteriza por presentar un micelio blanco y algodonoso, el cual además presenta una coloración naranja en la superficie del medio de cultivo, debido a la acumulación de conidios. En la naturaleza su desarrollo es favorecidos en ambientes con una humedad relativa alta, además de que la dispersión de esporas se ve aumentada cuando se presentan altas corrientes de aire lo que, además, puede generar heridas en el fruto, facilitando la entrada del patógeno (Nelson, 2008; Vidales *et al.*, 2005).

Este patógeno puede permanecer en el fruto en forma de apresorios sin mostrar daños en el tejido desde estadios tempranos de desarrollo. Posterior al corte y durante la maduración del fruto se generan los primeros daños en el tejido, los cuales indican la presencia del patógeno; además de las lesiones generadas en el fruto, el patógeno genera modificaciones en las características organolépticas del fruto. La antracnosis de frutos de aguacate Hass puede generar pérdidas postcosecha de entre 20 y 30% de la producción anual, además, a esto se le debe sumar los daños generados en flores, de los cuales se estima una pérdida aproximada de 15 a 20% de la floración anual por árbol. Según lo descrito por Nelson, (2008) la susceptibilidad a *C. gloeosporioides* varía entre los cultivares de *Persea americana*.

Los daños observados en el aguacate se presentan en el pericarpio (cáscara) del fruto, en la que se presentan lesiones corchosas, ligeramente hundidas, de color café, que pueden llegar a presentar zonas de color naranja, lo cual se debe a la acumulación de conidios del patógeno; además, en la pulpa del fruto se presentan lesiones de color café claro en estadios tempranos de la infección, los que posteriormente se tornan a color café oscuro (**Figura 12**) (Nelson, 2008; Vidales *et al.*, 2005).

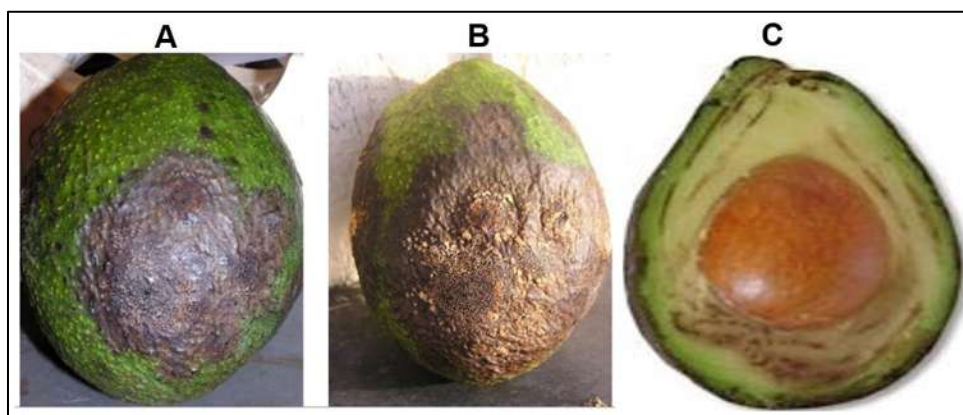


Figura 12. Lesiones causadas por *C. gloeosporioides* en aguacate Hass. **A.** Lesiones en cáscara. **B.** Lesiones en cáscara con masas de esporas color naranja. **C.** Lesiones en pulpa.

De acuerdo con Xoca-Orozco *et al.*, (2017), los frutos de *P. americana* cv. Hass fueron clasificados de acuerdo con su madurez en base a la coloración de la cáscara, clasificándose para los frutos de hasta cinco días postcosecha como frutos en madurez fisiológica, frutos de seis a nueve días en madurez intermedia y frutos de diez días postcosecha en madurez de consumo. Los frutos en madurez fisiológica no presentan síntomas causados por *C. gloeosporioides* en los tiempos analizados, como se observa en la **Figura 13-A**. En la **Figura 13-B** se observan las lesiones causadas en fruto en madurez intermedia, los cuales presentan lesiones a partir de las nueve horas posteriores a la inoculación del patógeno, mientras que en el fruto en madurez de consumo se observan daños en el tejido a las dos horas posteriores a la inoculación de *C. gloeosporioides* (**Figura 13-C**).

Así mismo, Nelson (2008) afirma que los síntomas causados por *C. gloeosporioides* pueden aparecer de uno a dos días después de la cosecha en frutos que parecían

estar sanos. Así mismo, reporta que la susceptibilidad al patógeno varía entre cultivares y variedades por lo que los tiempos de infección en cada variedad y cultivar son distintos.

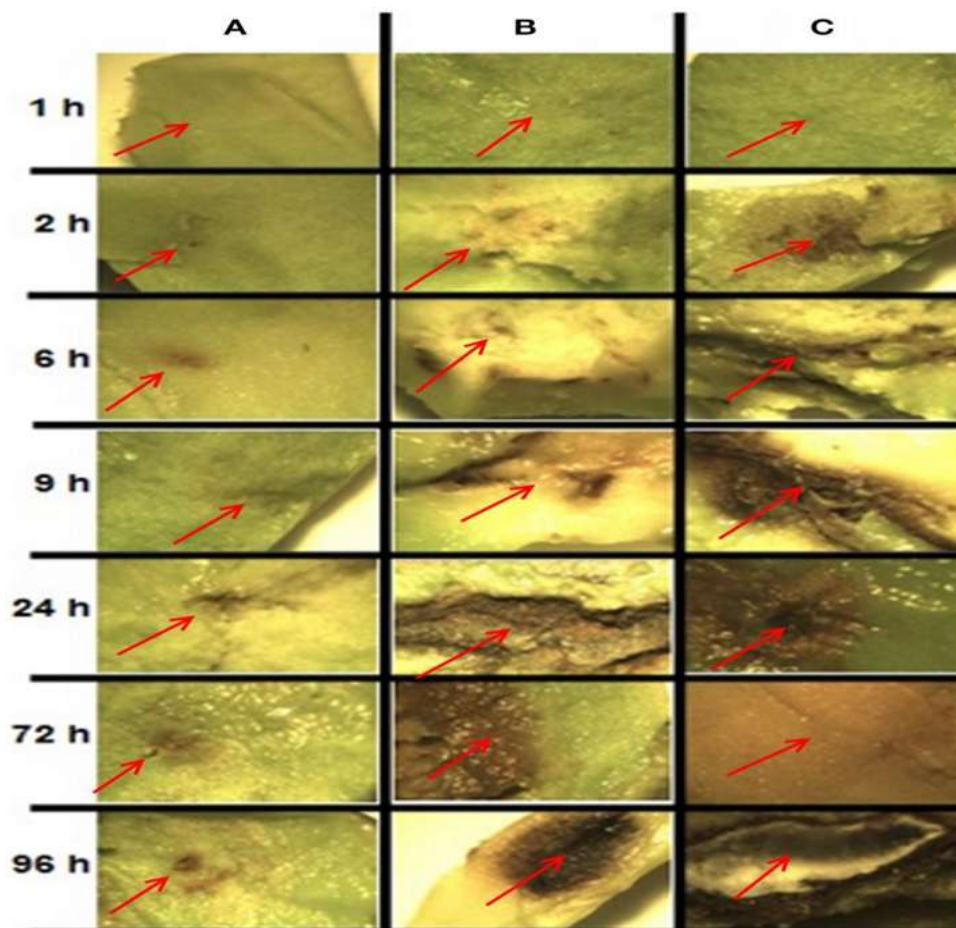


Figura 13. Cinética de infección de *C. gloeosporioides* en *P. americana* cv. Hass. **A)** Frutos en madurez fisiológica, **B)** Madurez intermedia y **C)** Madurez de consumo

3. ANTECEDENTES

3.1 Defensina PaDef de aguacate nativo mexicano

López-Gómez *et al.*, (2016), realizaron un trabajo sobre el transcriptoma del fruto de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) reportando los ESTs (del inglés: Expressed Sequence Tag) de frutos pre-climatéricos, climatéricos y post-climatéricos. Entre los mensajeros más abundantes de la pulpa preclimatérica se encontró el que codifica para una defensina. El transcrito no se encontró en el pericarpio y mesocarpio (pulpa) de los frutos climatéricos y post-climatéricos como se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Genes mayormente expresados en el mesocarpio de *P. americana* var. *drymifolia* durante la maduración (López-Gómez *et al.*, 2016).

Genes	Abundancia de ARNm en fruto (etapas de maduración):				
	Pre-climatérica	Climatérica		Post-climatérica	
	Pulpa	Cáscara	Pulpa	Cáscara	Pulpa
Quitinasas	106	371	566	7	114
Metalotioneinas	755	56	54	5	52
Defensinas	185	---	----	---	---

3.1.1 Características generales de PaDef

De acuerdo con lo descrito por Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013, este transcrito presenta 249pb, que genera un péptido de 78 aminoácidos con un peso molecular calculado de 5.2kDa, el cual mostró una homología mayor al 80% con otras defensinas de plantas previamente descritas como la defensina NaD1 de *Nicotiana glauca* y la defensina Rs-AFP1 de *Raphanus sativus*. Al realizarse un análisis bioinformático se encontró que el péptido presenta un péptido señal conformado por 31 aminoácidos, y los 47 aminoácidos restantes forman el dominio defensina. Al realizarse un alineamiento con las defensinas RS-AFP1 de *Raphanus sativus* y NaD1 de *Nicotiana glauca*, defensinas de tipo 1 y 2, respectivamente, se encontró que este péptido pertenece a las defensinas de tipo 1. Así mismo se encontró que el péptido presentó las 8 cisteínas conservadas de esta familia de péptidos como

se muestra en la **Figura 14-A**, los cuales forman 4 enlaces disulfuro (**Figura 14-B**), además de presentar el motivo α - β estabilizado por cisteínas (motivo CS α β) como se muestra en la **Figura 14-C**, también se puede observar que el péptido presenta 3 láminas β , las cuales se muestran como flechas de color rojo y una hélice α representada como un espiral azul.

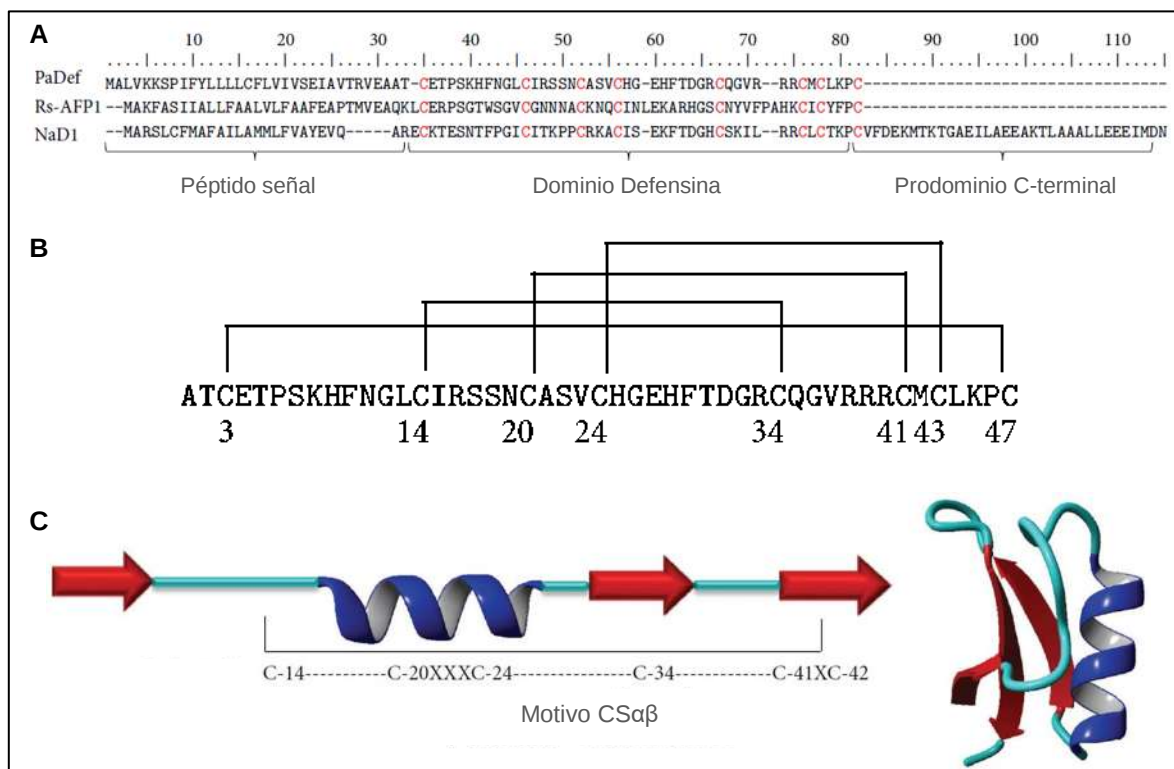


Figura 14. Características de la defensina PaDef de *P. americana* var. *drymifolia*. **A)** Alineamiento de la defensina PaDef con defensinas tipo 1 y 2 (Rs-AFP1 de *Raphanus sativus* y NaD1 de *Nicotiana alata*). **B)** Predicción de enlaces disulfuro de la defensina PaDef. **C)** Organización estructural de la defensina PaDef.

3.1.2 Actividad biológica de PaDef

Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2013), reportaron que el péptido PaDef presenta un efecto antibacteriano *in vitro* ya que inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a distintas concentraciones. En *S. aureus* se encontró que el efecto del péptido es dependiente de la concentración, mientras que en *E. coli* se encontró que a concentraciones de 100 μ g de proteína total, generan la inhibición del patógeno.

Meng *et al.*, (2017) purificaron el péptido recombinante PaDef el cual fue usado para conocer el efecto antibacteriano contra diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas a distintas concentraciones, los resultados encontrados se muestran en la **Tabla 8**, en donde se puede observar que el péptido recombinante PaDef presenta efecto antibacteriano contra diversas cepas de ambos tipos de bacterias.

Tabla 8. Efecto antibacteriano de PaDef recombinante purificado contra bacterias Meng *et al.*, (2017).

Cepas analizadas		Rango de inhibición (%)				
	PaDef recombinante purificado (µg/ml)	20	40	60	90	120
Gram Positivas						
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 21633)		36.1	40.3	91.7	97.5	99.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		0.0	0.0	64.9	95.5	99.1
<i>Bacillus subtilis</i> 151-1		25.8	45.6	46.3	54.9	97.4
<i>Bacillus subtilis</i> L300-1		0.0	2.6	12.5	98.8	99.5
<i>Bacillus subtilis</i> Lzz-133		14.2	31.7	45.2	99.6	99.7
<i>Enterococcus faecalis</i>		9.8	83.0	94.2	99.7	99.8
Gram Negativas						
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35150)		0.0	8.5	97.7	99.3	99.9
<i>Salmonella</i> (ATCC 10467)		0.0	0.0	22.5	97.0	99.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>		8.4	33.5	97.0	99.2	99.7
<i>Enterobacter sakazakii</i>		5.8	97.0	98.6	99.3	99.4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10305)		10.7	98.5	98.7	99.0	99.2

Así mismo, López-Gómez *et al.*, (2016), realizaron estudios para conocer el efecto antifúngico que presenta el péptido sintético a distintas concentraciones y se encontró que disminuye la viabilidad de *Candida glabrata* hasta un 70.4% a concentraciones entre 100 y 200 µg/mL del péptido PaDef y *Candida albicans* a concentraciones de 100 y 200µg/mL del péptido disminuye la viabilidad hasta un 25% como se muestra en la **Figura 15**.

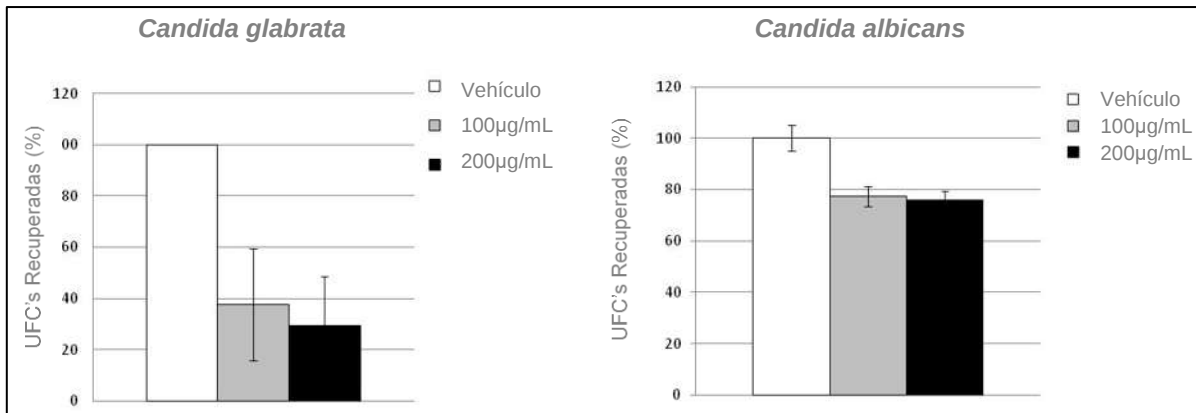


Figura 15. Actividad antifúngica de PaDef contra *Candida* spp. Efecto antifúngico de la defensina PaDef sintética con *Candida glabrata* y *Candida albicans* (López-Gómez et al., 2016).

4. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la expresión de los péptidos antimicrobianos puede ser constitutiva e inducible. Además, se ha demostrado que algunos péptidos de la familia de las defensinas se pueden expresar en diversos órganos de las plantas, así como durante el desarrollo y la maduración del fruto e inducirse en respuesta a algunos tipos de estrés como son la infección por patógenos, herida, sequía, salinidad, entre otros.

A pesar de que se ha demostrado actividad antimicrobiana de la defensina PaDef, aislada de *P. americana* var *drymifolia*, se desconoce su patrón de expresión en plantas y frutos de aguacate, así como en respuesta a estrés. Por lo anterior, es de interés realizar estudios sobre el patrón de expresión de esta defensina en plantas y frutos de *Persea americana*, así como su expresión durante la respuesta a *Colletotrichum gloeosporioides* y por el daño por herida.

5. HIPÓTESIS

La expresión de la defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) es constitutiva en la planta y durante el desarrollo del fruto, además es inducible durante la respuesta a estrés.

6. OBJETIVO GENERAL

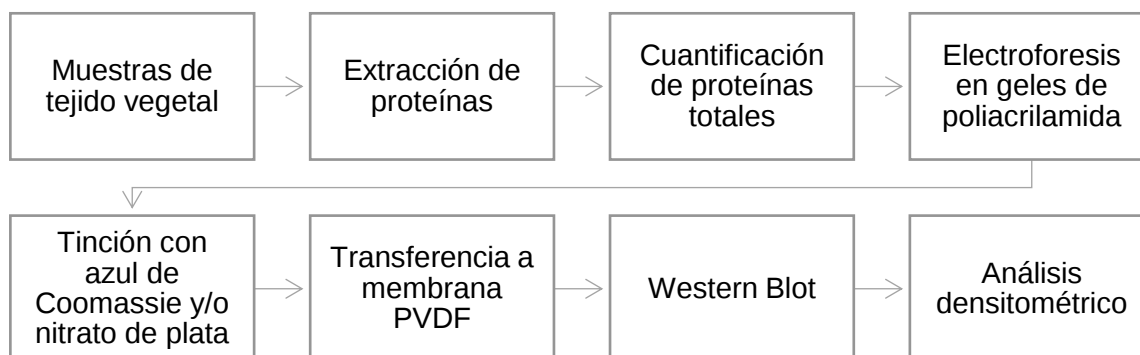
Caracterizar la expresión de la defensina PaDef en aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) durante el desarrollo del fruto, en la planta, así como en respuesta a herida y durante la infección por *Colletotrichum gloeosporioides*.

6.1 Objetivos específicos

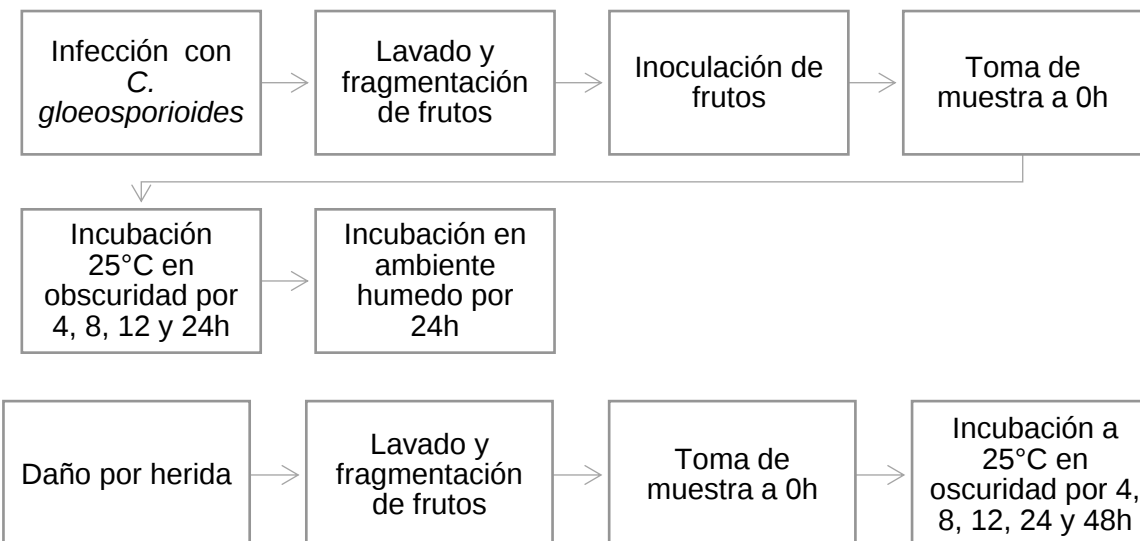
1. Determinar la expresión de la defensina PaDef en diferentes tejidos y estadios de desarrollo del fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), así como en frutos de la variedad americana (*P. americana* var. *americana*) y el cultivar Hass (*P. americana* Cv. Hass) en madurez de consumo.
2. Determinar la expresión de la defensina PaDef en diferentes tejidos de la planta de *P. americana* var. *drymifolia*.
3. Analizar la expresión de la defensina PaDef en respuesta a infección por *C. gloeosporioides* y daño por herida en frutos de *P. americana* var. *drymifolia* y de *P. americana* Cv. Hass.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

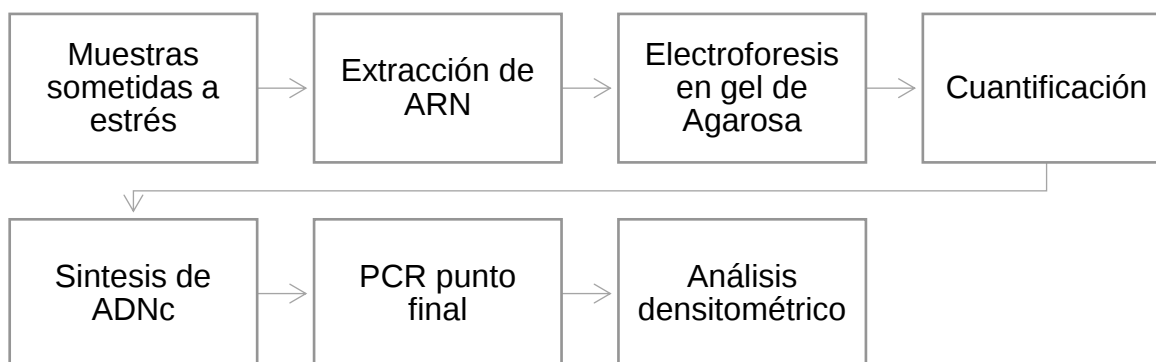
Objetivo específicos 1, 2 y 4: Determinar la expresión por ensayos tipo Western blot de la defensina PaDef.



Infección de frutos y daño por herida.



Material adicional: Análisis de la expresión del gen *PaDef* en respuesta a estrés.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

Frutos de *Persea americana* var. *drymifolia* (Cham. & Schltdl.) S.F.Blake fueron colectados en una huerta ubicada en Uruapan Mich. de dos árboles de más de 50 años, los cuales presentan un aroma característico anisado en sus hojas, además de que los frutos presentan una cascara lisa y delgada de coloración negra a morada al madurar, la que difícilmente se desprende de la pulpa, además de una semilla de gran tamaño. Los frutos seleccionados no presentaban daños en la cáscara. Los frutos fueron colectados aproximadamente a los 4 meses (inmaduros), a los 8 meses (madurez fisiológica), así como a los 3 días posteriores al corte (madurez de consumo), de acuerdo a lo descrito por Ibarra-Laclette *et al.*, (2015). Su peso osciló entre 18 a 95g en peso fresco. También se obtuvieron hojas y flores a partir del árbol productor de estos frutos.

Para realizar las pruebas de expresión de PaDef en los diferentes tejidos de la planta, fueron utilizadas plántulas germinadas a partir de la siembra de semillas de frutos en estudio.

Los frutos de *P. americana* cv. Hass se colectaron en el mismo sitio de muestreo. Los frutos seleccionados fueron frutos en madurez fisiológica los cuales se mantenían unidos al pedúnculo y no presentaban daños en la cáscara, los frutos se analizaron al alcanzar su madurez de consumo (aproximadamente 8 días posteriores al corte). Estos frutos se caracterizaron por presentar una cáscara gruesa y rugosa de color negro al madurar, que se desprende fácilmente de la pulpa. Su peso osciló entre 125 y 225g de peso fresco.

Los frutos de *P. americana* var. *americana* fueron adquiridos en un mercado local en Mérida Yucatán. Los frutos presentaban una cáscara lisa de color verde al madurar, la cual se desprende fácilmente de la pulpa. Los frutos usados no mostraban daños en la cáscara y su peso osciló entre 290 y 420g en peso fresco.

Los tejidos obtenidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

8.2 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó por el método de Saravanan y Rose (2004), que se basa en una extracción realizada con fenol y posteriormente la precipitación de las proteínas con acetato de amonio en metanol. Para obtener el extracto proteico se realizó lo siguiente: Muestras de 100mg de tejido congelado y pulverizado se mezclaron con 500 μ L de Buffer de extracción (0.5M Tris HCl pH 7.5, 0.5M EDTA, 0.1M KCl, 0.7M Sacarosa y 1% Polivinilpolipirrolidona), 10 μ L de β -Mercaptoetanol y 5 μ L de PMSF, y se mantuvieron en agitación en hielo durante 30 minutos, posteriormente se les adicionó 500 μ L de Fenol, se homogeneizaron y se mantuvieron en agitación 30 minutos, las mezclas se centrifugaron a 12,000 g durante 30 minutos. La fase fenólica se separó y se mezcló con 5 volúmenes de Acetato de amonio en metanol al 8% y se dejaron precipitar durante la noche a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g durante 30 minutos, se desechó el líquido y la pastilla se lavó con 300 μ L de Metanol absoluto frio y centrifugadas a 12,000 g por 5 minutos, se desechó el metanol y las pastillas se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 50 μ L de Buffer de Resuspensión (0.05M Tris HCl pH 7.4, 0.2M NaCl, 0.02M NaHCO₃, 0.02M MgSO₄, 0.01M EDTA y 10% Glicerol) y 2 μ L de SDS al 10% y se mezclaron hasta la disolución de la pastilla, se adicionaron 2 μ L de β -Mercaptoetanol y 5 μ L de PMSF y se mezcló nuevamente para posteriormente centrifugar y separar el sobrenadante. Al terminar las muestras fueron almacenadas a -20°C.

8.3 Cuantificación de proteínas totales por curva de Bradford

Para la realización de la curva de calibración de Bradford se usó como proteína standard la albumina sérica bovina (BSA). Las concentraciones del estándar proteico fueron 100, 250, 500, 700 y 1000 μ g/mL. A partir de estas concentraciones se mezclaron 5 μ l con 500 μ L de reactivo de Bradford y se dejaron reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente para su posterior cuantificación (Bradford 1976).

Los estándares para la curva de calibración fueron cuantificados en un Eppendorf Biophotometer 6131 UV/Vis Spectrophotometer en el cual las muestras se medieron en la función Bradford (595nm) en celdas de plástico.

Para la cuantificación de las muestras se mezclaron 1µl de la muestra de proteína total o 1µL de Buffer de Resuspensión (Blanco) con 500µL de Reactivo de Bradford y se dejaron reaccionar por 15 minutos para posteriormente cuantificar. Las muestras usadas presentaron una concentración igual o mayor a 700 µg/mL.

Así mismo, las muestras fueron cuantificadas en Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers usando la función de Protein A280 para lo cual fueron usados 2µl buffer de resuspensión como blanco el cual fue medido en pedestal, para las muestras cuantificadas se utilizó, así mismo, 2 µL de cada muestra, las muestras usadas presentaron una concentración igual o mayor a 700µg/mL.

8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Los geles de poliacrilamida fueron elaborados según lo descrito por Laemmli y Favre (1973). El gel de poliacrilamida está formado por 2 partes: el gel de separación y el concentrador. Estos geles fueron preparados al 13 y 4% respectivamente con los componentes que se indican en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Preparación de los geles de poliacrilamida.
Reactivos y volúmenes empleados

Reactivo	Gel de separación (13%)	Gel concentrador (4%)
Agua destilada estéril	2.4 mL	0.8 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.25 mL	-----
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	-----	0.39 mL
Acrilamida (49.5% T, 1% C)	1.3 mL	0.26 mL
SDS 10%	50 µL	15.6 µL
Persulfato de amonio 10%	25 µL	11.7 µL
TEMED	5 µL	1.15 µL

Se utilizaron muestras de 10 µg de proteína total para cargar los geles de poliacrilamida y separar las proteínas de los diferentes tejidos. Las muestras fueron mezcladas con Buffer de carga (0.06M Tris HCl pH 6.8, 12.5% Glicerol, 2% SDS,

0.0144M β -Mercaptoetanol y 0.1% de Azul de Bromofenol) a una relación de 4:1, posteriormente se desnaturalizaron a 65°C durante 15 minutos.

Las muestras fueron cargadas en los geles de poliacrilamida los cuales fueron corridos a 60 Volts por 15-25 minutos y a 120 Volts por 45-55 minutos usando Buffer de Glicina (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS a pH 8.3).

Los geles se realizaron por duplicado para posteriormente llevar uno a tinción y otro a transferencia.

8.5 Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Después de correr el gel, éste fue fijado durante 15 minutos en solución fijadora (50% Metanol, 10% Ácido acético glacial y 40% Agua destilada). Transcurrido este tiempo se desechó la solución y se adiciono la solución de tinción durante 20 minutos (10% ácido acético glacial, 0.05% azul de Coomassie y 89.95% agua destilada). Posteriormente se desechó la solución y se enjuagó el gel con agua destilada para después adicionar la solución de destinción (7% ácido acético glacial, 5% metanol y 88% agua destilada) hasta la completa eliminación del colorante en el gel (Laemmli y Favre 1973). Las proteínas se observaron en un fotodocumentador Hoefer MacroVue UVis-20.

8.6 Tinción de proteínas con nitrato de plata

Después de correr, el gel fue fijado durante 1 hora en solución de fijación (50% metanol, 10% ácido acético glacial y 40% agua desionizada). Después se desechó la solución y se le adicionó agua desionizada para rehidratar el gel durante 30 minutos, para posteriormente adicionar la solución sensibilizadora (0.02% tiosulfato de sodio) con la cual se incubó durante 1 minuto. Transcurrido este tiempo se enjuagó tres veces durante 20 segundos con agua desionizada para posteriormente incubarse durante 20 minutos en la solución de nitrato de plata fría (0.15% nitrato de plata y 0.02% formaldehído). Se realizaron tres enjuagues de 20 segundos con agua desionizada y se cambió de recipiente, enjuagándose durante 1 minuto con agua. Posteriormente se adicionó la solución de revelado (3% carbonato de sodio y 0.05% formaldehído) durante 3-5 minutos, se enjuagó con agua desionizada

durante 20 segundos y se le adicionó la solución terminadora (5% ácido acético) durante 5 minutos (Schägger, 2006).

8.7 Electrotransferencia de proteínas a membranas PVDF

Se realizaron transferencias semisecas, para esto el gel de poliacrilamida se equilibró con buffer Blotting o Bjerrum y Schafer-Nielsen (0.048M Tris, 0.039M glicina, 20% metanol a pH 9.2) durante 15 minutos. La membrana de PVDF fue permeabilizada durante 15 segundos en metanol y 2 minutos en agua destilada. Posteriormente se equilibró con Buffer Blotting durante 20 minutos. Se equilibraron 6 papeles filtro de mayor tamaño que la membrana en buffer Blotting por 10 minutos.

Se colocó sobre el cátodo del Transblot 3 de los papeles filtro equilibrados, seguida de la membrana PVDF y el gel para después colocar los 3 papeles filtro restantes. Se colocó el ánodo y se conectó el Transblot a la fuente de energía. La transferencia se realizó a un amperaje constante de 0.07Amperes durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró la membrana para realizar el Western Blot.

8.8 Anticuerpo Anti-PaDef

El anticuerpo Anti-PaDef es un anticuerpo policlonal, el cual fue sintetizado por la empresa BIOMATIK al inocular la defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) en conejos hasta obtener una respuesta inmune, para posteriormente ser purificado mediante cromatografía de afinidad.

8.9 Western blot con anticuerpos primarios Anti-PaDef y Anti-Actina

El Western Blot se realizó con TBS (0.1M Tris-HCl pH 7.2 y 0.15M NaCl); la membrana se incubó durante 1 hora con TBST (0.1M Tris-HCl pH 7.2, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20 y 1% albúmina de huevo) con los anticuerpos primarios Anti-Actina y Anti-PaDef con títulos de 1:5000, transcurrido este tiempo se enjuagó 2 veces con TBS durante 10 segundos. Posteriormente se incubó durante 30 minutos con TBST con el anticuerpo secundario Anti-Rabbit con títulos de 1:2000 y se enjuagó 2 veces por 10 segundos con TBS. Posterior a esto se realizó un enjuague de 1 minuto con la solución I (0.1M Tris pH 7.2 y 0.15M NaCl) seguido de otro enjuague de 3 minutos

con la solución II (0.1M Tris pH 7.2, 0.05M MgCl₂ y 0.1M NaCl). Después la membrana se colocó en una caja Petri cubierta con papel aluminio para su posterior revelado.

Para la solución de revelado se mezclaron 2.5 ml de NBT (Cloruro de nitroblue tetrazolium), 2.5 ml de BCIP (Sal de la p-Toluidina de fosfato 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilo) y 20 ml de agua destilada. Esta solución se adicionó en la caja Petri con la membrana y se agitó durante 15 minutos o hasta la aparición de las bandas, la membrana es enjuagada en agua y secada.

8.10 Análisis densitométrico

Para realizar el análisis de imágenes se usó el software ImageJ a partir del cual se obtuvieron las áreas por carril en el gel de poliacrilamida teñido, a partir de estos datos se realizó el cálculo de las concentraciones aproximadas por carril, las cuales sirvieron para hacer correcciones en las imágenes de las membranas. Para las membranas así mismo fue calculada el área por banda presente en cada carril (Actina y PaDef) y se realizó el ajuste de concentración correspondiente a cada carril del gel teñido. A partir de estos datos se obtuvo la expresión de los péptidos antes mencionados en cada tejido.

8.11 Infección de frutos con *C. gloeosporioides*

El hongo *C. gloeosporioides* se inoculó en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubó durante 7 días a 25°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo de incubación, se tomó una pequeña cantidad de micelio y se colocó en un portaobjetos, donde se mezcló con agua estéril para visualizar las esporas en microscopio óptico.

A partir del micelio de *C. gloeosporioides* se obtuvo una suspensión de esporas en una concentración de 1×10^6 esporas/mL. Las esporas fueron obtenidas del micelio mediante la adición de 5 mL de agua estéril y raspado del mismo, evitando la presencia del micelio. Posteriormente se determinó el número de esporas en una cámara de Neubauer para ajustar la concentración indicada de esporas.

8.11.1 Estrés por infección fúngica

Los frutos de *P. americana* var. *drymifolia* y *P. americana* cv. Hass en madurez de consumo fueron lavados con agua estéril y se dejaron secar para posteriormente realizar los cortes necesarios en cada fruto para obtener fragmentos de entre 3 y 5 g de peso fresco. Los fragmentos restantes se colocaron en recipientes de plástico y se inocularon con 2 μ L de la suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1×10^6 esporas/mL) y 2 μ L de agua estéril para la muestra control, se tomó la muestra a las 0 horas y posteriormente se cerraron los recipientes los que se colocaron en oscuridad a 25°C e incubados por 4, 8, 12 y 24 horas, tiempos a los que se analizaron las muestras. Transcurridas las 24 horas, se incubó otro fragmento en ambiente húmedo para favorecer el desarrollo del patógeno por 24 horas más (48 horas), lo cual se realizó con la finalidad de observar el avance de la infección y/o el crecimiento del micelio en el tejido.

Las muestras de tejido se tomaron en los diferentes tiempos, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

8.11.2 Estrés por daño por herida

Para realizar la cinética de daño por herida, los frutos se lavaron con agua estéril y se dejaron secar para posteriormente realizar los cortes necesarios a cada fruto para obtener fragmentos de entre 3-5 g de peso fresco. A partir de estas muestras se tomó la muestra a tiempo 0 (0 horas) y las muestras restantes se colocaron en recipientes de plástico y se incubaron en oscuridad a 25°C por 4, 8, 12 y 24 horas, tiempos en los que se analizaron las muestras. Transcurridas las 24 horas se colocó otro fragmento de fruto en ambiente húmedo por 24 horas más (48hrs) con la finalidad de observar si el fruto presentaba crecimiento de patógenos lo que indicaría la contaminación de la muestra, lo que a su vez podría arrojar resultados erróneos en pruebas posteriores.

Las muestras se sometieron a ensayos tipo western blot siguiendo la metodología descrita en las secciones 8.2 a 8.8.

8.12 Análisis de la expresión de *PaDef* por PCR semicuantitativo

La expresión del gen *PaDef* fue analizada bajo estrés por infección fúngica y daño por herida en frutos de *P. americana* var. *drymifolia* y *P. americana* cv. Hass.

a) Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se usó el método descrito por López-Gómez, Gómez-Lim (1992). 100 mg de muestra se mezclaron con 600 μ L de Buffer de lisis (0.15M Tris-Borato pH 7.5, 0.05M EDTA y 2% SDS) a 65°C y 2 μ L de β -mercaptoetanol y se calentaron por 15 minutos a 65°C, se mezcló el homogenizado con 16.6 μ L acetato de potasio 5M y 275 μ L de etanol 100% frío y se mezcló durante 1 minuto, para después centrifugar muestras a 10,000 g por 10 minutos de las que fue recuperada la fase acuosa, la que se mezcló con un volumen igual de PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 50:49:1) y se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos para recuperar la fase acuosa, a la que se le adicionó 1/3 del volumen de cloruro de litio 9M y se precipitó durante la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 RPM durante 20 minutos, se desechó el líquido y la pastilla se dejó secar para posteriormente resuspender en 30 μ L de agua destilada estéril. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

b) Electroforesis en gel de Agarosa

Con la finalidad de visualizar la integridad de las muestras de ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñida con bromuro de etidio a un voltaje de 90 volts por aproximadamente 30 minutos.

c) Cuantificación de ARN

Las muestras se cuantificaron en Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers usando la función de ácidos nucleicos para lo cual fueron usados 2 μ L de agua estéril como blanco, el que fue medido en pedestal. Para las muestras cuantificadas se utilizó, así mismo, 2 μ L de cada muestra y se obtuvieron concentraciones en ng/ μ L.

d) Eliminación de ADN

Para la digestión de ADN se mezclaron las muestras de RNA con 1 μ L de Buffer de Reacción de DNasa I (10X), 1 μ L de DNasa I, así como, agua inyectable para completar 10 μ L. Esta mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos para posteriormente desactivarse con la adición de 1 μ L de EDTA (0.025M) y calentando a 65°C por 10 minutos.

e) Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc se prepararon mezclas de reacción con un volumen final de 20 μ L, para lo que se mezclaron 1 μ g de ARN total, 1 μ L de Primer Random y el volumen restante para completar 12.5 μ L se adicionó de agua libre de nucleasas. Se adicionaron 4 μ L de Buffer de Reacción 5X, 0.5 μ L de RNasa out, 2 μ L de mezcla de dNTP's (0.010M), 0.5 μ L de Enzima Reverso Transcriptasa. Completar 20 μ L de mezcla con agua libre de nucleasas (0.5 μ L).

Las mezclas se incubaron a 42°C por 60 minutos para posteriormente calentarse a 70°C por 10 minutos. Para comprobar la calidad de ADNc se corrió un gel agarosa. Los ADNc fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

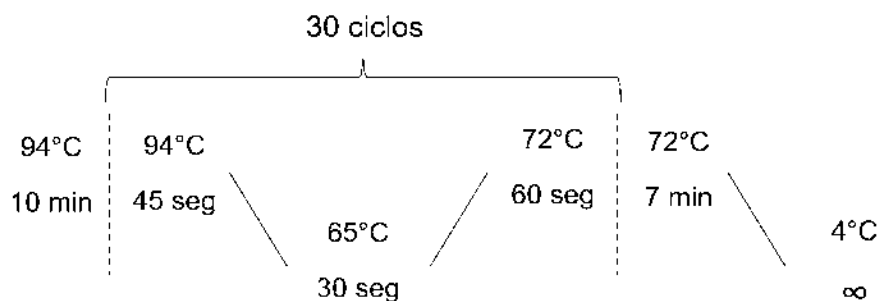
f) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final

Se realizó un PCR punto final para lo cual se emplearon: 0.2 μ L de dNTP's 2mM, 1.0 μ L de Buffer Taq 10X, 0.3 μ L de MgCl₂ 25mM, 1 μ L de Taq Polimerasa 10 μ M, 4.3 μ L de Agua, 0.2 μ L de Oligo Fw 10mM, 0.2 μ L de Oligo Rv 10mM y 1 μ L ADNc 100ng/ μ L, se obtuvieron mezclas de reacción con un volumen final de 10 μ L.

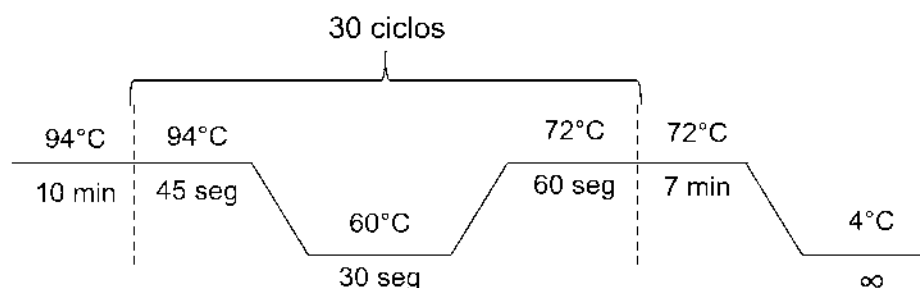
Los oligonucleótidos empleados son *PaDef* como gen problema y *60S* y *SUMO* como genes endógenos.

El programa para los PCRs fue el siguiente:

Gen problema: *PaDef*



Genes endógenos: *60S* y *SUMO*



Los productos de amplificación fueron detectados por electroforesis en gel de Agarosa al 1.2%, teñida con Bromuro de Etidio a un Voltaje de 90 por aproximadamente 30 minutos.

g) Análisis Densitométrico

Para el análisis de imágenes se empleó el programa ImageJ a partir del cual se obtuvieron las áreas aproximadas por banda obtenida en cada muestra analizada.

h) Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el software Statistics en el cual se realizaron pruebas de ANOVA de 1 y 2 vías para las pruebas cuantitativas, así como la prueba t de student para las pruebas cualitativas.

9. RESULTADOS

9.1 Proporción de tejidos por fruto

Los frutos obtenidos durante las colectas se pesaron y separados en semilla, pulpa y cáscara, y a partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje promedio por tejido en peso fresco, los resultados fueron analizados usando la prueba de ANOVA de 2 vías con un valor de $p \leq 0.05$. Los resultados mostraron que la semilla *P. americana* var. *drymifolia* representa aproximadamente el doble que en los frutos de *P. americana* var. *americana* y de *P. americana* cv. Hass, así mismo el porcentaje de pulpa es menor al 60% en *P. americana* var. *drymifolia*, mientras que el porcentaje en *P. americana* var. *americana* y *P. americana* cv. Hass, es mayor al 70%. En relación a la cáscara los 3 frutos muestran un porcentaje similar (10% $\pm$ 2) como se muestra en la **Figura 16**.

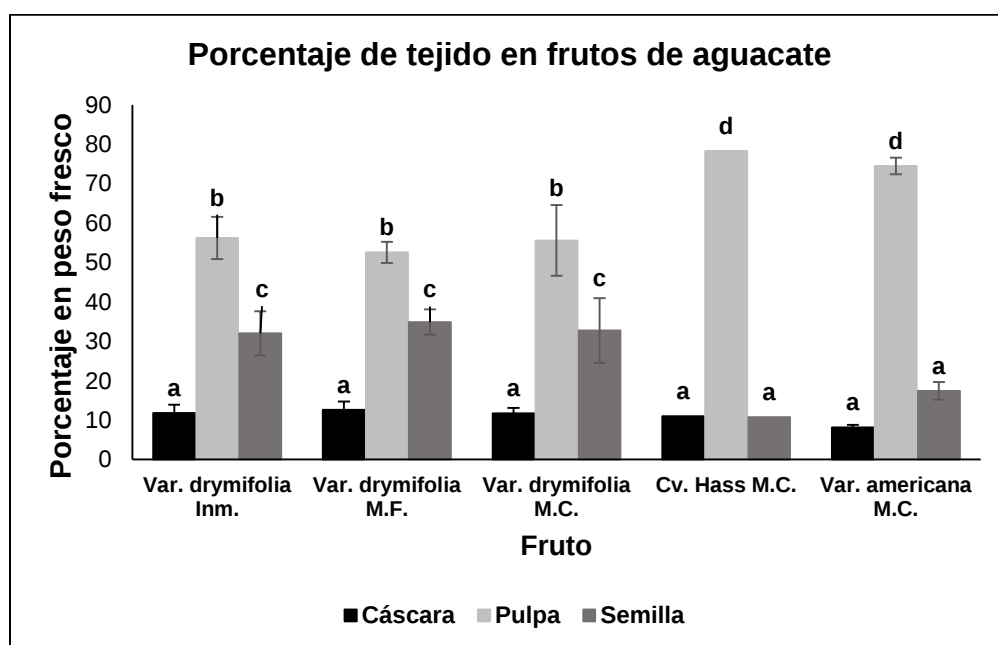


Figura 16. Porcentaje por tejido en *Persea americana*. Porcentaje de cáscara, pulpa y semilla en *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* var. *americana* y *P. americana* cv. Hass en diversos estadios de maduración. **Inm:** Inmaduro, **M.F.:** Madurez Fisiológica y **M.C.:** Madurez de Consumo. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de una muestra mínima de 5 frutos. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

Estos datos muestran que los frutos seleccionados de *P. americana* var. *drymifolia* presentan una semilla de gran tamaño, lo que ha sido reportado para esta variedad por Barrientos y López, en 1998, una característica distintiva de los frutos de esta variedad.

9.2 Extracción de proteínas totales y electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Se realizó la extracción de proteínas por el método descrito y se usaron muestras a una concentración final de 10µg de proteína total, las cuales se corrieron en geles de poliacrilamida al 13% en donde se pudo observar concentraciones similares entre las muestras usadas como se muestra en la **Figura 17**, además se observó la presencia de bandas de un peso molecular aproximado al de PaDef (5.2kDa), como se muestra en la **Figura 17** (recuadro rojo).

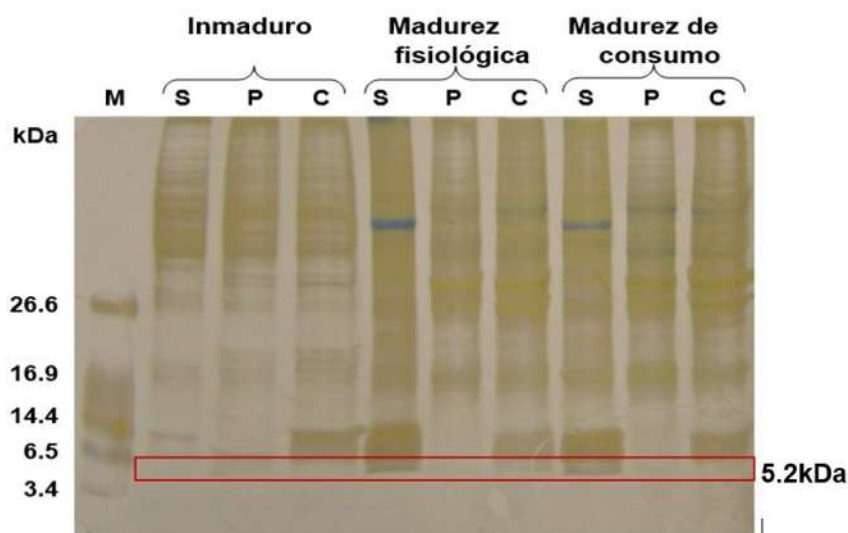


Figura 17. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 13%. Muestras de 10µg de proteína total teñido con nitrato de plata. Tejidos analizados de frutos de *P. americana* var. *drymifolia*: **S**: Semilla, **P**: Pulpa y **C**: Cáscara de frutos Inmaduros, en Madurez fisiológica y Madurez de consumo.

9.3 Ensayo tipo Western blot

Como pruebas iniciales con el anticuerpo Anti-PaDef se realizaron pruebas con el péptido sintético PaDef y con muestras de proteína total de pulpa de *P. americana* var. *drymifolia* en madurez de consumo. Se encontró que el anticuerpo muestra una sola banda en la muestra de pulpa de aguacate. Además de que reconoce el péptido

desde concentraciones de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del péptido sintético PaDef (Sintetizado por BIOMATIK a partir de la secuencia reportada en el NCBI) como se muestra en la **Figura 18**.

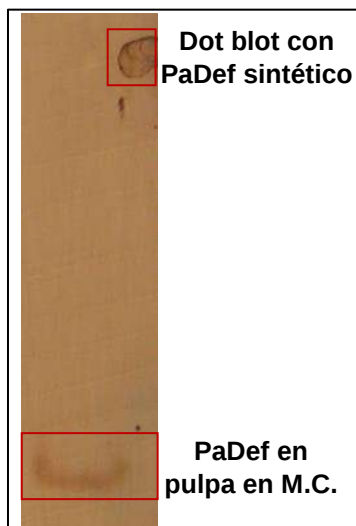


Figura 18. Ensayo tipo Western blot. Péptido sintético PaDef ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), Pulpa en madurez de consumo ($25\mu\text{g}$ de proteína total).

9.4 Expresión del péptido PaDef durante el desarrollo del fruto

Para conocer la expresión de la defensina PaDef durante el desarrollo del fruto se analizaron los siguientes tejidos: Semilla, Pulpa y Cáscara de frutos inmaduros, en madurez fisiológica y en madurez de consumo. Las muestras analizadas contenían $10\mu\text{g}$ de proteína total, con la finalidad de conocer si las concentraciones empleadas de muestra eran comparables, se realizó la tinción de un gel de poliacrilamida con azul de Coomassie, con el que se mostraron concentraciones similares, además se realizó una tinción con nitrato de plata la cual mostró concentraciones similares en las muestras analizadas. Posteriormente se realizó un Western blot con los anticuerpos Anti-PaDef (péptido problema) y Anti-Actina (proteína endógena), observando que el péptido muestra distintos niveles de expresión en todos los tejidos analizados. Como se muestra en la **Figura 19**, los tejidos que muestran una menor expresión del péptido son los provenientes de semillas en los estadios analizados, seguidos de los de pulpa y mostrando una mayor expresión del péptido en la cáscara de los frutos analizados.

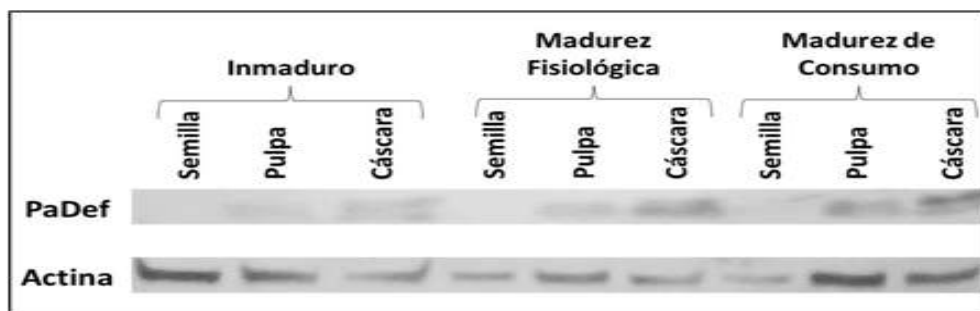


Figura 19. Western Blot de muestras de *P. americana* var. *drymifolia* durante la maduración del fruto. Tejidos analizados: cáscara, pulpa y semilla de frutos inmaduros, en madurez fisiológica y en madurez de consumo.

Con el análisis densitométrico se normalizo la expresión del péptido problema entre la proteína endógena (PaDef/Actina), obteniendo los niveles de expresión relativa de PaDef. Con el análisis estadístico (prueba de t de student con un valor establecido de $p \leq 0.05$), los datos fueron graficados usándose los promedios de la expresión en cada tejido analizado.

Al realizar una comparativa entre los niveles de expresión presentes en los tejidos, se asignó al tejido con el nivel de expresión más bajo un valor arbitrario (1.0, semilla de fruto en madurez fisiológica). En la **Figura 20** se puede observar que los niveles de expresión en semilla no presentan diferencias estadísticamente significativas en los frutos inmaduros y en madurez fisiológica, mientras que, en la semilla de los frutos en madurez de consumo se observa un aumento altamente significativo en la expresión del péptido PaDef. En la pulpa se observa un comportamiento similar al presente en semilla, para la cáscara se observan distintos niveles de expresión, presentándose una mayor expresión en el fruto en madurez fisiológica, sin diferencias estadísticamente significativas.

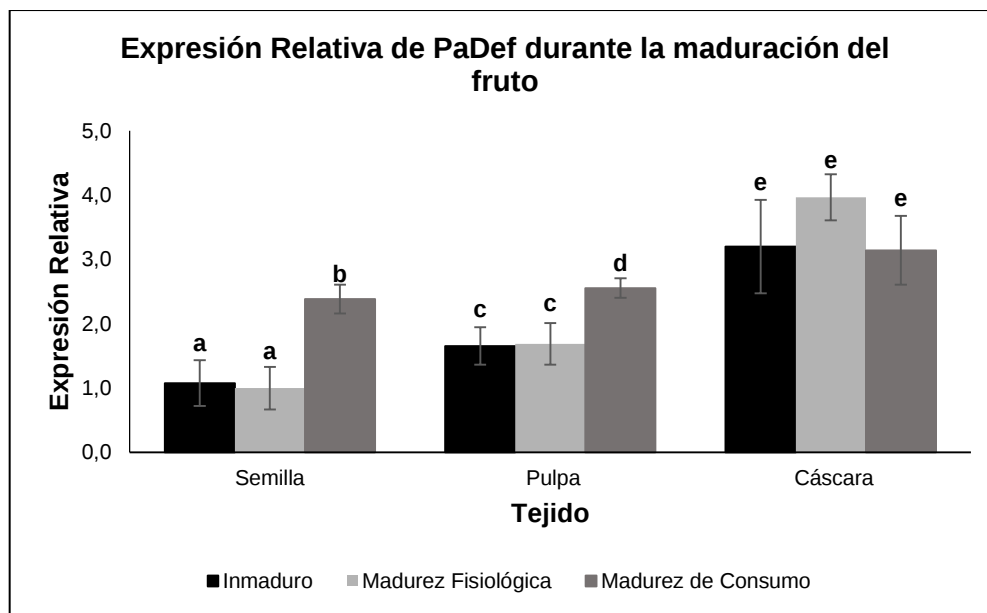


Figura 20. Expresión relativa de PaDef en *P. americana* var. *drymifolia* durante la maduración del fruto. Estado de maduración de los frutos analizados: Inmaduro, Madurez fisiológica y Madurez de consumo. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 2 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

9.5 Expresión del péptido PaDef en diferentes frutos de *P. americana*

Al igual que en el apartado anterior se analizó la expresión del péptido PaDef en *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* cv. Hass y *P. americana* var. *americana* en madurez de consumo, separándose los tejidos de cada fruto para los análisis de expresión. Al realizarse el Western blot de estos tejidos se encontró que la menor expresión del péptido PaDef se presenta en semilla y visualmente se observa una expresión similar en las pulpas y cáscaras analizadas como se muestra en la **Figura 21**.

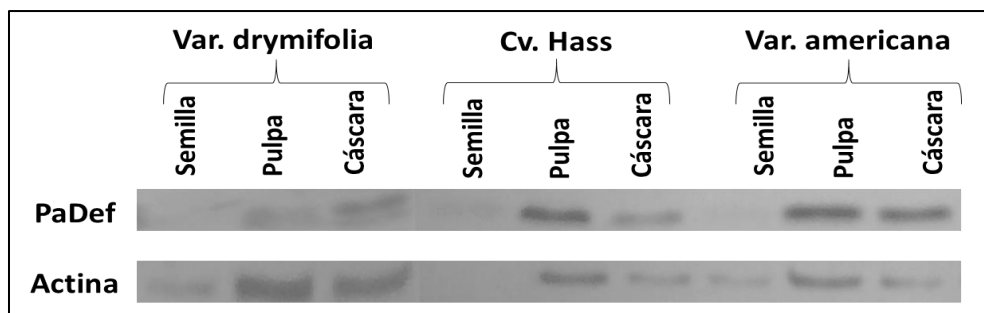


Figura 21. Expresión de PaDef en frutos de *P. americana* en madurez de consumo. Muestras de *P. americana* var. drymifolia, *P. americana* cv. Hass y *P. americana* var. americana. Tejidos analizados: cáscara, pulpa y semilla.

Para conocer los niveles de expresión entre los tejidos de los frutos analizados se le asignó un valor arbitrario (1.0) al tejido con menor nivel de expresión (semilla de *P. americana* var. americana) y se realizó el ajuste de los datos basándose en este nivel mínimo de expresión. Los resultados se muestran en la **Figura 22** en la cual se observa que en semilla la menor expresión del péptido PaDef está presente en *P. americana* var. americana, mientras que, la mayor expresión se presenta en *P. americana* cv. Hass, al ser más de tres veces mayor que en *P. americana* var. americana, en el caso de *P. americana* var. drymifolia se encontró que la expresión es ligeramente menor a la presente en *P. americana* cv. Hass, sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

En pulpa, la mayor expresión se presenta en *P. americana* var. americana, mientras que la expresión en *P. americana* var. drymifolia y en el cultivar Hass, son casi iguales, sin diferencias estadísticamente significativas. Para cáscara se encontró que *P. americana* cv. Hass presenta la menor expresión, seguida de *P. americana* var. drymifolia, con una mayor expresión en *P. americana* var. americana, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

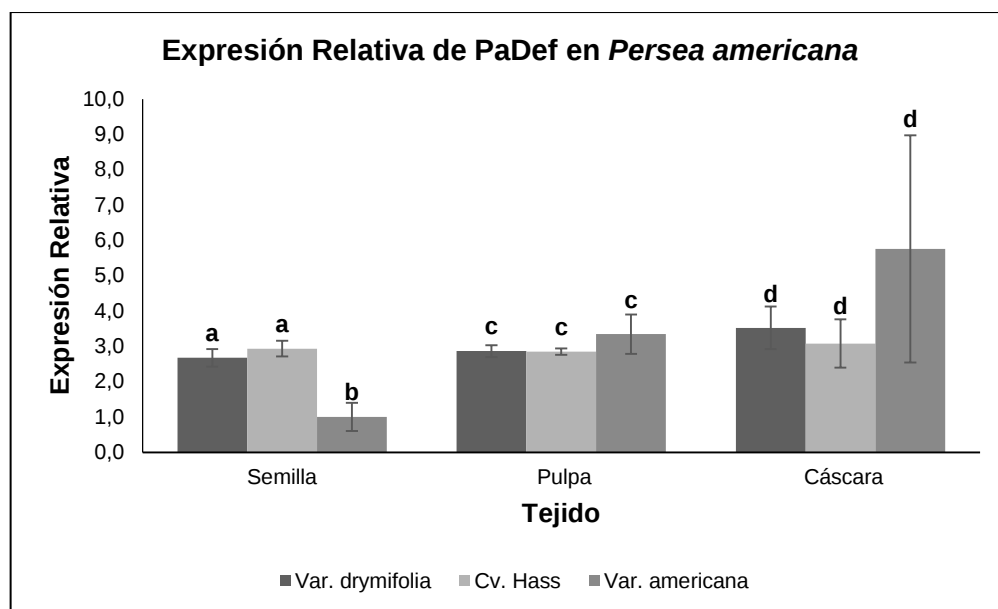


Figura 22. Expresión relativa de PaDef en *P. americana*. Frutos analizados: *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* cv. Hass y *P. americana* var. *americana*. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 2 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

9.6 Expresión del péptido PaDef en tejidos de *P. americana* var. *drymifolia*

Se analizaron los tejidos de raíz, tallo, hoja y flor encontrándose diversos niveles de expresión en todos los tejidos analizados; la menor expresión se observó en raíz, seguida de la flor, la expresión de PaDef en tallo y hoja se muestra en la **Figura 23** es similar.

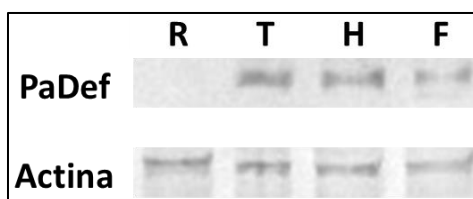


Figura 23. Analisis de la expresión de PaDef en plantas de *P. americana* var. *drymifolia*. Tejidos analizados: **R:** Raíz, **T:** Tallo, **H:** Hoja y **F:** Flor.

Al igual que en los casos anteriores se realizó el análisis densitométrico del péptido problema y la proteína endógena, para posteriormente normalizar los datos obtenidos (PaDef/Actina). Al tejido que presentaba una menor expresión (raíz) se le asignó el valor arbitrario de 1.0 y posteriormente se escalaron los demás datos; esto mostró que como se mencionó anteriormente, la expresión es menor en raíz,

mientras que en flor la expresión de PaDef es más del doble y la del tallo y hoja es más del triple de la presentada en raíz. En estos valores no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de PaDef en tallo y hoja, pero si en raíz y flor (**Figura 24**).

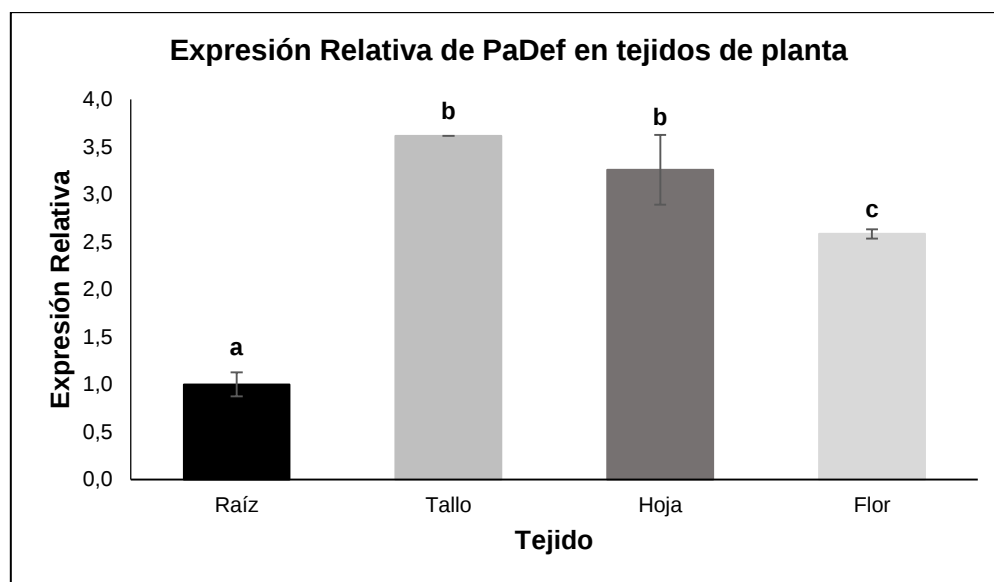


Figura 24. Expresión relativa de PaDef en plantas de *P. americana* var. *drymifolia*. Tejidos analizados: Raíz, Tallo, Hoja y Flor. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 2 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

9.7 Infección de frutos de *P. americana* con *C. gloeosporioides*

En la **Figura 25-A** se presenta el cultivo de 7 días de *C. gloeosporioides* el que presenta una coloración naranja claro en la base del medio de cultivo, correspondiente a la acumulación de conidios en el medio, además de presentar esporas como se muestra en la **Figura 25-B**. La concentración de esporas presentes en la suspensión (**Figura 25-C**), fue ajustada a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL.

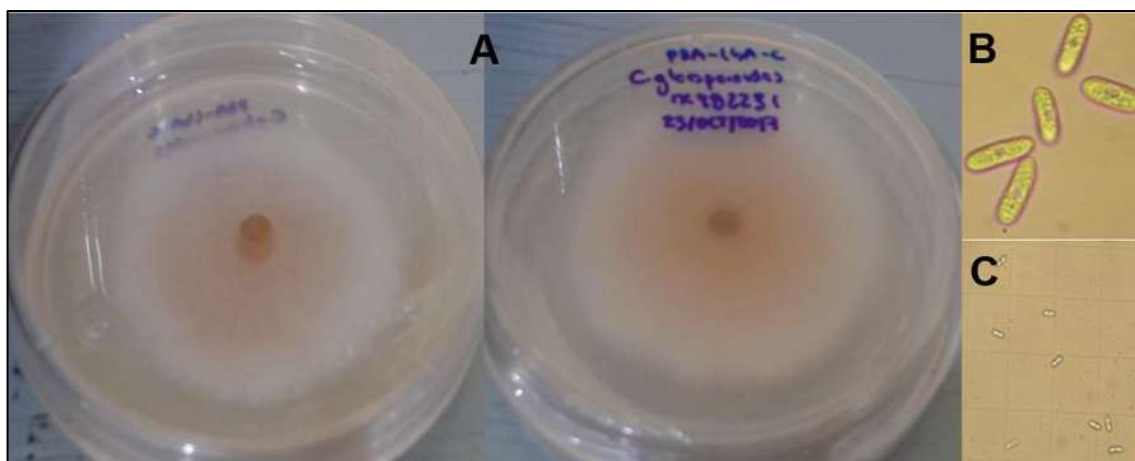


Figura 25. Cultivo de *C. gloeosporioides* por 7 días en medio PDA (A); Esporas visualizadas en microscopio óptico con objetivo 40x (B); Cuantificación de esporas visualizada en microscopio óptico con objetivo 20x (C).

Con la suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* obtenida se realizó la infección de los frutos en madurez de consumo (3 días posteriores al corte para *P. americana* var. *drymifolia* y entre 5, y 6 días posteriores al corte para *P. americana* cv. Hass), para lo cual fueron inoculados 2 μ L de la suspensión de esporas a 1×10^6 esporas/mL, siendo inoculadas alrededor de 2000 esporas en cada fragmento de fruto, mientras que el fragmento del fruto control fue inoculado con 2 μ L de agua estéril.

En los tiempos analizados se encontró que en *P. americana* var. *drymifolia*, los frutos no presentaron daños visibles durante las 12 horas posteriores a la inoculación del patógeno (**Figura 26-B, C y D**), mientras que los de *P. americana* cv. Hass presentaron daño en el tejido a partir de las 4 horas posteriores a la inoculación (**Figura 27-B, C, D**). Después de 14 horas de exposición al patógeno, se observó el crecimiento de las zonas de daño en *P. americana* cv. Hass y a las 16 horas en *P. americana* var. *drymifolia* se observó un ligero oscurecimiento de la zona de inoculación el cual fue aumentando, mostrando que, a las 24 horas, las zonas de inoculación además de la modificación en la coloración presentaron un ligero hundimiento en el centro de la lesión (**Figura 26-E**). A las 24 horas, los frutos de *P. americana* cv. Hass mostraron lesiones en los sitios de inoculación del patógeno, así como en la zona radial. Cuando éstos se sometieron a un ambiente húmedo, se favoreció el crecimiento del patógeno, encontrando mayores zonas de

daño en el fruto de *P. americana* var. *drymifolia*, mientras que los frutos del cultivar Hass, mostró además el crecimiento del micelio (**Figura 27-E**). Los frutos no tratados mostraron una ligera oxidación del tejido a las 24 horas de inoculación (**Figuras 26-A y 27-A**). Es importante destacar que la apariencia de los frutos se vio modificada a partir de las 8 horas posteriores al tratamiento en los frutos analizados.

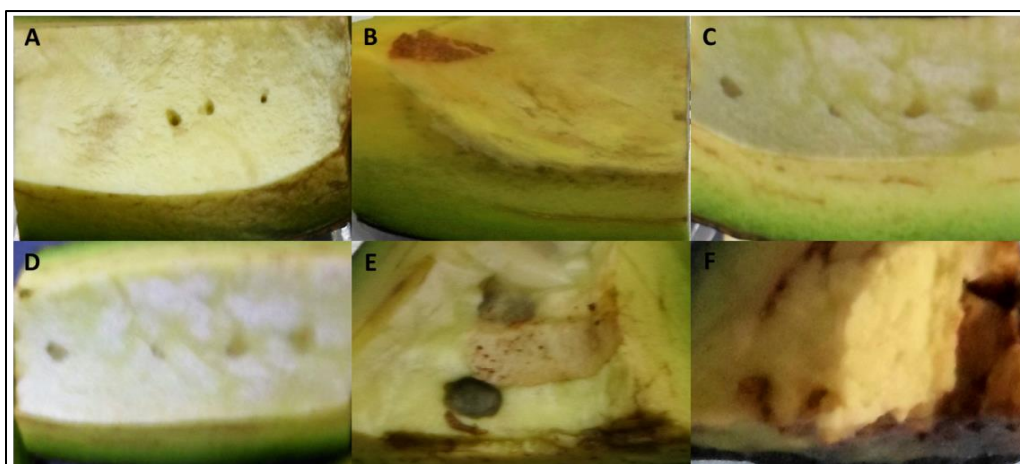


Figura 26. Fragmentos de frutos de *P. americana* var. *drymifolia* inoculados con 2 μ L de suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* a concentración de 1×10^6 esporas/mL e incubados a 25°C en oscuridad. **A)** Control **B)** Fruto 4h post-inoculación, **C)** Fruto 8h post-inoculación, **D)** Fruto 12h post-inoculación, **E)** Fruto 24h post-inoculación y **F)** Fruto 48h post-inoculación.

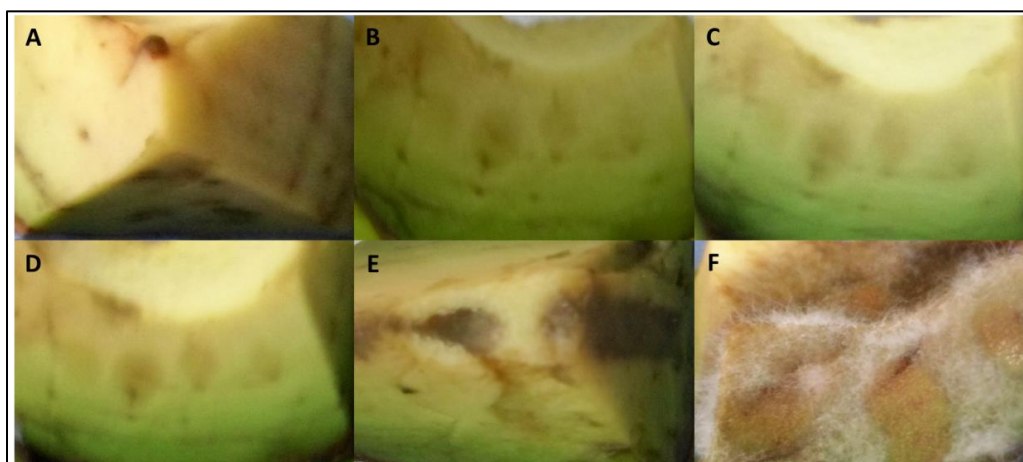


Figura 27. Fragmentos de frutos de *P. americana* cv. Hass inoculados con 2 μ L de suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* a concentración de 1×10^6 esporas/mL e incubados a 25°C en oscuridad. **A)** Control **B)** 4h **C)** 8h **D)** 12h **E)** 24h y **F)** 48h post-inoculación.

9.8 Cinética de daño por herida en frutos de *P. americana*

Para la cinética de daño por herida no se observaron modificaciones considerables en los frutos analizados, solo una ligera oxidación en el tejido durante los tiempos analizados como se muestra en las **Figuras 28 y 29**.

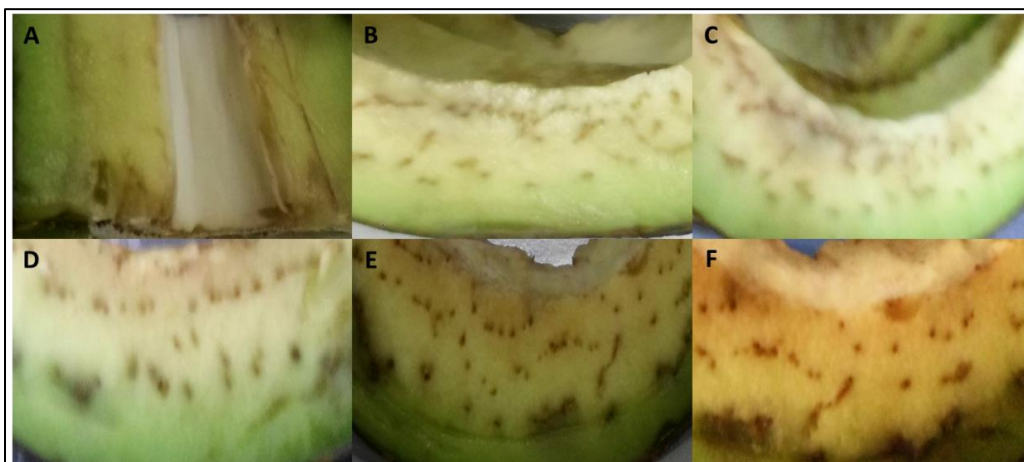


Figura 28. Fragmentos de frutos de *P. americana* var. *drymifolia*. Cortado e incubado a 25°C en oscuridad. **A)** Control, **B)** 4h, **C)** 8h, **D)** 12h, **E)** 24h y **F)** 48h posterior a herida.

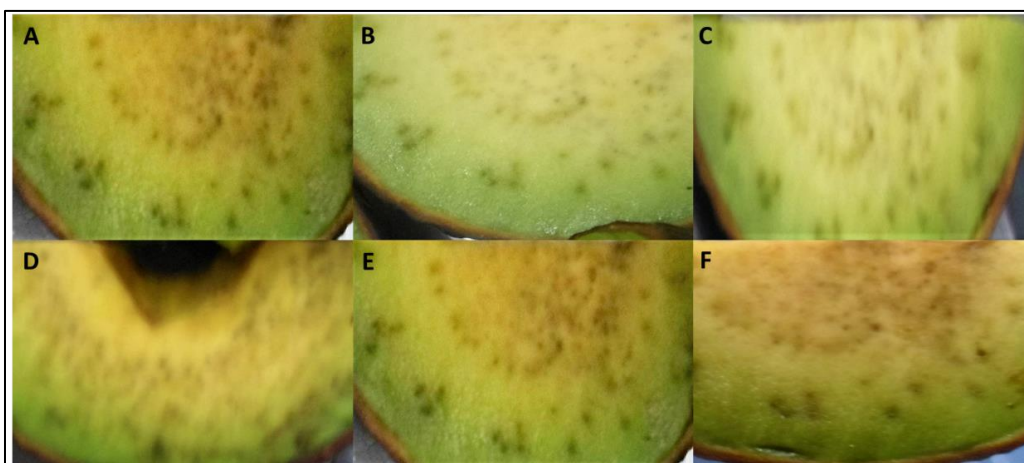


Figura 29. Fragmentos de fruto de *P. americana* cv. Hass. Cortado e incubado a 25°C en oscuridad. **A)** Control **B)** Fruto 4h posterior a herida, **C)** Fruto 8h posterior a herida, **D)** Fruto 12h posterior a herida, **E)** Fruto 24h posterior a herida, **F)** Fruto 48h posterior a herida.

9.9 Expresión del péptido PaDef en respuesta a estrés

Para conocer la expresión del péptido PaDef en respuesta a estrés, se analizaron muestras sometidas a la infección por *C. gloeosporioides* y daño por herida durante 0, 4, 8, 12 y 24 horas, posterior al tratamiento. Al realizar el Western blot se observaron distintos niveles de expresión en los tiempos analizados, así como en los tratamientos de estrés empleados, como se muestra en las **Figuras 30 y 31**.

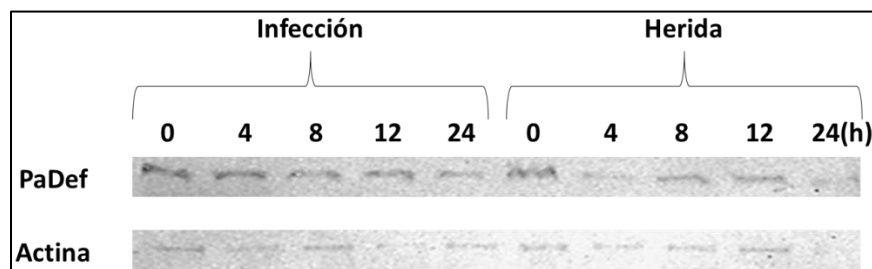


Figura 30. Análisis de la expresión por ensayo de Western blot de PaDef de *P. americana* var. *drymifolia* en respuesta a estrés. Western Blot de muestras de *P. americana* var. *drymifolia* infectadas con *C. gloeosporioides* (0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores a inoculación) y bajo daño por herida (0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores a daño).

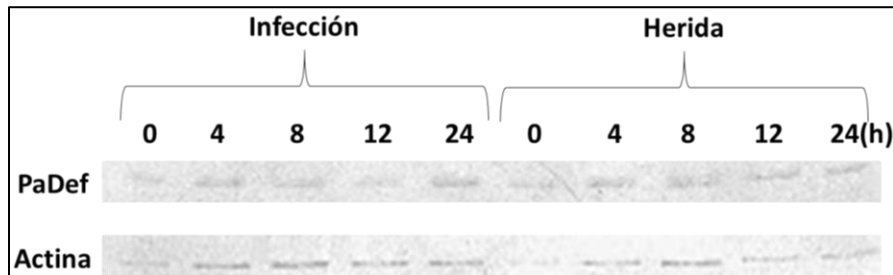


Figura 31. Análisis de la expresión por ensayo de Western blot de PaDef de *P. americana* cv. *Hass* en respuesta a estrés. Western Blot de muestras de *P. americana* cv. *Hass* infectadas con *C. gloeosporioides* (0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores a inoculación) y bajo daño por herida a (0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores a daño).

Como se observa en la **Figura 32**, los frutos de *Persea americana* var. *drymifolia* tratados con el patógeno mostraron una expresión relativa del péptido PaDef con un aumento de más de 4 veces a las 4 horas posteriores a la inoculación del patógeno, resultado que muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con la expresión mostradas a las 0, 8, 12 y 24 horas analizadas. Después la expresión disminuyó a niveles menores a los presentes a las 0 horas,

observándose además un aumento en la expresión del péptido a las 12 horas, sin diferencias significativas en comparación con la expresión mostradas a las 0, 8, 12 y 24 horas analizadas. Para el tratamiento de daño por herida, se encontró que la expresión del péptido disminuye ligeramente en los tiempos analizados sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

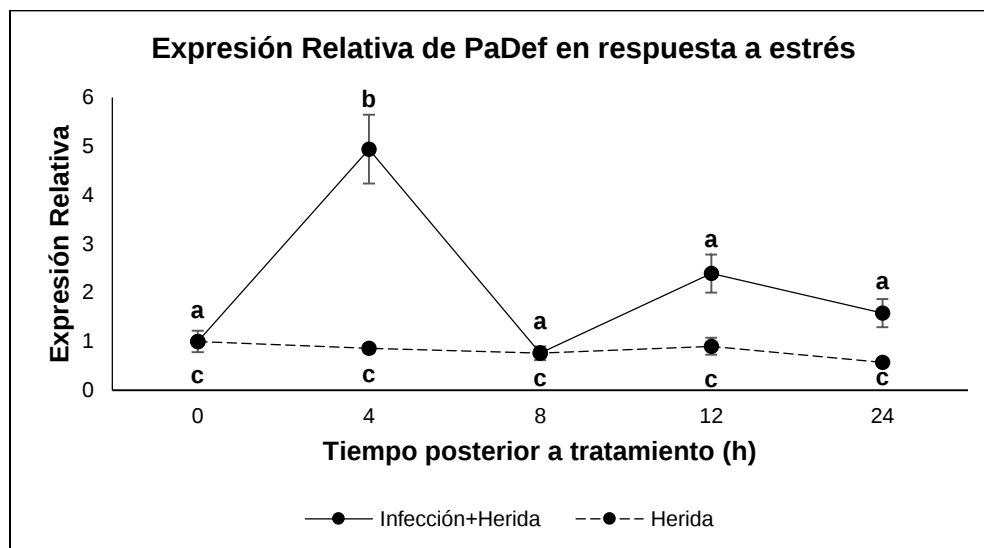


Figura 32. Análisis de la expresión relativa de PaDef en *P. americana* var. *drymifolia* en respuesta a estrés mediante Western blot. Las muestras analizadas corresponden a tiempos de 0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores al tratamiento. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 2 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$ en una prueba de ANOVA de una vía.

En los frutos de *P. americana* cv. Hass sometidos a infección, los niveles de expresión presentan una disminución a las 4 horas posteriores a la inoculación del patógeno, mientras que en los tiempos posteriores (8 y 12 horas) se presenta un aumento en ésta, mayor a los niveles presentes a las 0 horas, seguido de una ligera disminución en la expresión del péptido PaDef, sin observar diferencias estadísticamente significativas. La expresión relativa de PaDef en los frutos sometidos a daño por herida se encontró que, a las 4 y 8 horas posteriores al daño, se presentó un ligero aumento en la expresión del péptido PaDef, para posteriormente mostrar una disminución de la expresión, al igual que en la expresión mostrada en los frutos tratados con el patógeno, las diferencias no mostraron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 33**).

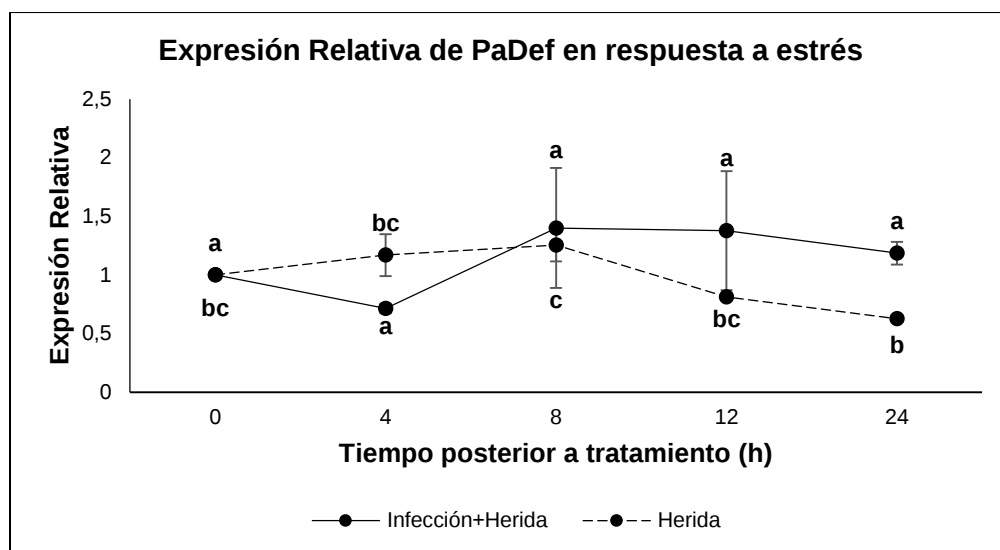


Figura 33. Análisis de la expresión relativa de PaDef en *P. americana* cv. Hass en respuesta a estrés mediante Western blot. Las muestras analizadas corresponden a tiempos de 0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores al tratamiento. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 2 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$ en una prueba de ANOVA de una vía.

9.10 Material adicional

Expresión de *PaDef* en respuesta a estrés por ensayo PCR-semicuantitativo

Dado que los datos hasta este punto no eran totalmente concluyentes se procedió a realizar el análisis de la expresión por PCR semicuantitativo del gen *PaDef* en las muestras de frutos de *P. americana* var. drymifolia y del cultivar Hass, sometidas a estrés, con la finalidad de tener una mejor perspectiva del comportamiento de la expresión de este gen durante la respuesta a estrés. Los niveles de expresión del gen *PaDef* se normalizaron con la expresión del gen endógeno 60S, este gen fue seleccionado ya que presentaba un comportamiento más estable en comparación con SUMO.

En los frutos de *P. americana* var. drymifolia sometidos a infección y herida se encontró que la expresión relativa del gen, en ambos tratamientos, muestra un comportamiento similar durante los tiempos analizados, como se muestra en la **Figura 34**, sin observar variaciones estadísticamente significativas en la expresión del gen a las 0, 4, 8 y 12 horas posteriores a la infección. Sin embargo, a las 24

horas posteriores al tratamiento se observó un aumento en la expresión de *PaDef* con un valor altamente significativo, que coincide con la presencia de necrosis del tejido en el tratamiento de la infección, así como un ablandamiento del tejido en ambos tratamientos. En respuesta a herida, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas a las 0, 4 y 8 horas posteriores al daño generado, mientras que a las 12 horas se presenta una disminución en la expresión, la cual al completarse las 24 horas, alcanza niveles similares a los presentados a las 0 horas de tratamiento.

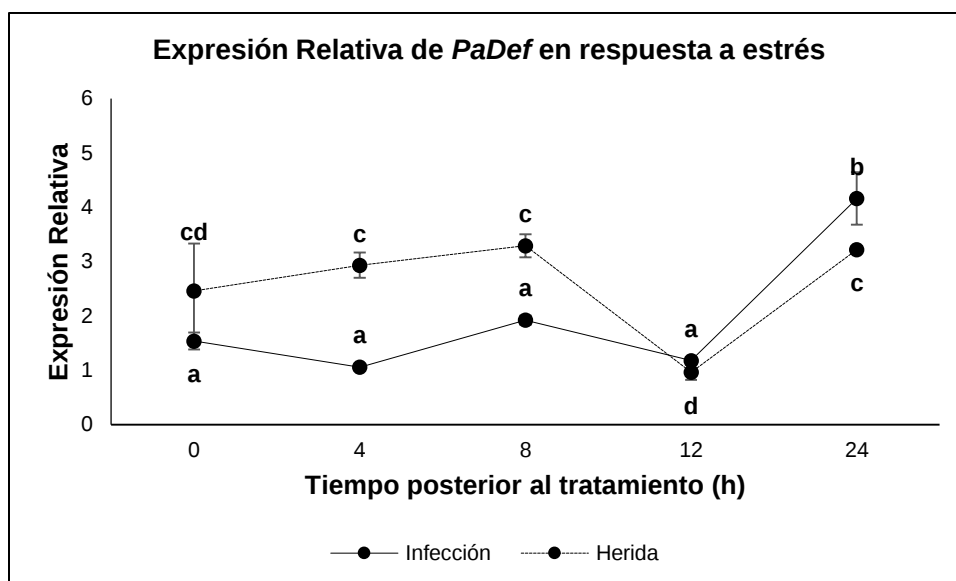


Figura 34. Análisis de la expresión relativa de *PaDef* en mesocarpio de *P. americana* var. drymifolia en respuesta a estrés por PCR semicuantitativo. Las muestras analizadas corresponden a tiempos de 0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores al tratamiento. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 3 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$ en una prueba de ANOVA de una vía.

En los frutos de *P. americana* cv. Hass tratados con el patógeno no se presentaron diferencias estadísticamente significativas hasta las 8 horas posteriores a la inoculación como se muestra en la **Figura 35**, mientras que a las 12 horas se presentó un aumento en la expresión del gen *PaDef*, la cual es altamente significativa. Este aumento coincide con el aumento de tamaño en las lesiones observadas en el tejido, al completarse las 24 horas posteriores a la inoculación del patógeno, en la que la expresión del gen mostró un nivel menor al presentado a las 0 horas de tratamiento. El fruto tratado por daño por herida mostró un aumento en

la expresión del gen a las 8 y 12 horas posteriores al daño, seguido de la disminución a las 24 horas a un nivel de expresión similar al presentado a las 0 horas.

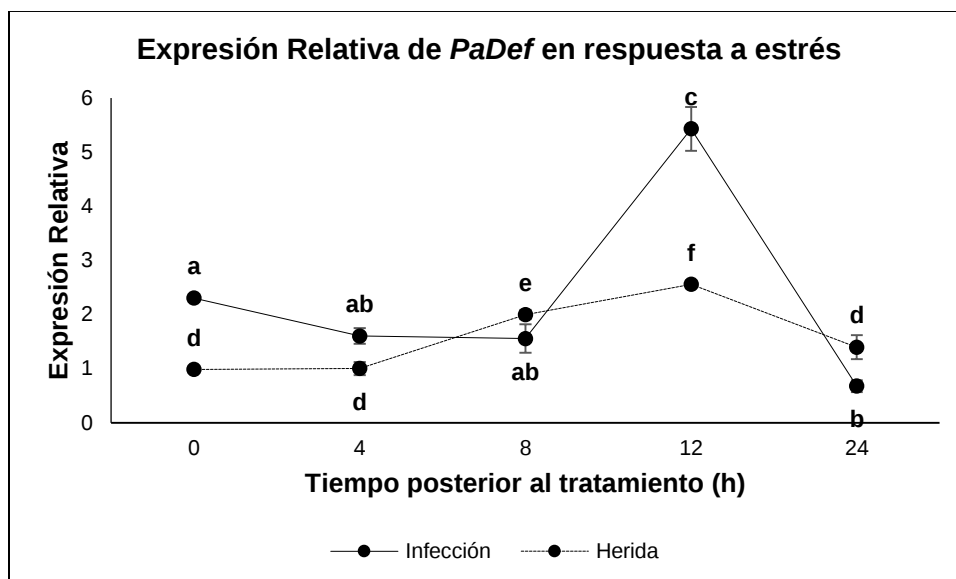


Figura 35. Análisis de la expresión relativa de *PaDef* en mesocarpio de *P. americana* cv. Hass en respuesta a estrés por PCR semicuantitativo. Las muestras analizadas corresponden a tiempos de 0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores al tratamiento. Los datos representan el valor promedio $\pm$ D.E. de 3 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$ en una prueba de ANOVA de una vía.

10. DISCUSIÓN

Barrientos y López, (1998) describieron algunas características específicas de las tres variedades de *Persea americana* (*P. americana* var. *americana*, *P. americana* var. *guatemalensis* y *P. americana* var. *drymifolia*), entre las cuales se encuentran las altitudes y climas óptimos de crecimiento, así como las características distintivas que presentan los frutos de estas variedades, destacando para esta investigación que los frutos de *P. americana* var. *drymifolia* presenta una semilla de gran tamaño.

De acuerdo con los datos obtenidos se encontró que la semilla de los frutos seleccionados de *P. americana* var. *drymifolia* presentan una diferencia de porcentaje altamente significativa si se compara con las semillas de los frutos de *P. americana* var. *americana* y del cultivar Hass como se puede observar en la **Figura 16**.

López-Gómez *et al.*, (2016) encontraron una abundante expresión de un transcrito relacionado con la defensa (PaDef) en pulpa de fruto preclimatérico de *P. americana* var. *drymifolia*, mientras que en la pulpa y cáscara de frutos climatéricos y postclimatéricos no se encontró la presencia de éste. Sin embargo, se desconoce el patrón de expresión de este péptido en diferentes tipos de fruto de aguacate, así como en la planta y en estrés de plantas, como por infección fúngica y por daño por herida, de aguacate nativo mexicano.

Al conocerse las funciones del péptido PaDef, fue de interés conocer el patrón de expresión en diferentes estructuras de las plantas y durante la maduración de los frutos de *P. americana* var. *drymifolia*, para los que se realizaron ensayos de Western blot en los cuales se analizaron frutos inmaduros, en madurez fisiológica y en madurez de consumo, encontrándose distintos niveles de expresión en los tejidos analizados (semilla, pulpa y cáscara), así como en los estadios de maduración analizados, siendo la menor expresión la presente en la semilla de los tres estadios, seguido de pulpa y cáscara (**Figura 19**).

Al realizarse los análisis densitométrico y estadístico se encontró que la expresión del péptido PaDef mostraron una expresión relativa similar en las semillas de fruto

inmaduro y en madurez fisiológica, mientras que en madurez de consumo se observó un aumento significativo en la expresión. En pulpa se observó un aumento similar en el mismo estadio de maduración, mientras que en cáscara los niveles de expresión relativa no presentan diferencias significativas (**Figura 20**). De acuerdo a lo planteado por Meneguetti *et al.*, (2017) este aumento en la expresión se puede deber a que con esto el fruto presenta una mayor protección al ataque de patógenos, que aumenta la integridad del fruto y favorece la maduración de la semilla.

Estos datos indican que la defensina PaDef es constitutiva durante el desarrollo y maduración del fruto de *P. americana* var. *drymifolia* al igual que las defensinas *CDef1* y *J1* de *Capsicum annuum* los cuales se expresan durante la maduración del fruto (Maarof *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 1995).

También se ha demostrado la expresión de diversas defensinas durante el desarrollo y maduración de fruto entre variedades y cultivares de algunos frutos como son la defensina *CADEF1* de *Capsicum annuum* cv. Hanbyul, *CDef1* de *Capsicum annuum* var. MC11 y la defensina *J1* de *Capsicum annuum* var. Yolo Wonder y la defensina *J1-1* de *Capsicum annuum* cv. Nokkwang (Do *et al.*, 2004; Maarof *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 2014).

Debido a esto se realizaron análisis de la expresión de PaDef en frutos de *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* cv. Hass y *P. americana* var. *americana* en madurez de consumo, lo cual nos ayudara a correlacionar si este péptido interviene en la resistencia al ataque de patógenos. Se encontró que la defensina PaDef presenta distintos niveles de expresión en semilla, pulpa y cáscara en los frutos analizados como se muestra en la **Figura 21**, siendo la menor expresión de PaDef en las semillas.

Así mismo, se encontró que el péptido PaDef muestra una menor expresión en semilla de *P. americana* var. *americana*, la expresión en *P. americana* var. *drymifolia* y del cultivar Hass presentan una expresión estadísticamente similar, por otro lado, la expresión de PaDef en pulpa y cáscara no muestra diferencias estadísticamente significativas (**Figura 22**).

Esto muestra que la defensina PaDef tiene una expresión constitutiva en los frutos en madurez de consumo de *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* cv. Hass y *P. americana* var. *americana*.

Diversos estudios demuestran que las defensinas son constitutivas en tejidos de planta como es el caso de la defensina *NbDef1.1*, *1.2*, *1.3*, *1.4* y *1.6* de *Nicotiana benthamiana* las cuales son constitutivas en raíz, tallo, hoja, flores y semilla o las defensinas *Hc-AFP1*, *2*, *3* y *4* de *Heliophila coronifolia* quienes se expresan en tallos, hojas, flores, semillas y silicuas (Bahramnejad *et al.*, 2009; De Beer y Vivier, 2011).

Al analizar la expresión de PaDef en tejidos de planta de *P. americana* var. *drymifolia* se encontró que este péptido se expresa en raíz, tallo, hoja y flores, presentando una menor expresión en raíz, seguida de flor, tallo y hojas (**Figura 23**). Posterior al análisis densitométrico, se encontró que la raíz muestra el menor nivel de expresión, en la flor, la expresión es más del doble de la expresión presentada en raíz, mientras que en tallo y hoja la expresión es más de 3 veces mayor a la presentada en raíz (**Figura 24**).

Con esto se demuestra que la defensina PaDef es constitutiva en tejidos de plantas de *P. americana* var. *drymifolia* (raíz, tallo, hoja y flor).

Tomando en cuenta que las defensinas cuentan con la capacidad de inducirse en respuesta a estrés como es el caso de la defensina *CADEF1* de *Capsicum annuum* la cual se induce en respuesta al patógeno *Xanthomonas campestris*, daño por herida y elicitores abióticos, así como las defensinas enlistadas en la **Tabla 4** (Do *et al.*, 2004; Lay y Anderson, 2005), es de interés conocer si la defensina PaDef se induce en respuesta a patógenos y herida. Para esto se realizó la cinética de infección en mesocarpo de frutos de *P. americana* var. *drymifolia* y cv. Hass en madurez de consumo con el patógeno *C. gloeosporioides* y daño por herida.

Al infectarse los frutos se encontró que *P. americana* cv. Hass presenta una mayor susceptibilidad al patógeno al presentar lesiones desde las 4 horas posteriores a la inoculación, mientras que *P. americana* var. *drymifolia* presenta lesiones visibles a

partir de las 16 horas posteriores a la inoculación. Además, al completarse 48 horas de inoculación, en ambos frutos se pudo observar el crecimiento de micelio en *P. americana* cv. Hass mientras que en *P. americana* var. *drymifolia* solo se observa un aumento en el área de las lesiones (**Figuras 26 y 27**).

En el ensayo de daño por herida se observó un comportamiento similar en los frutos analizados (**Figuras 28 y 29**).

De acuerdo a lo descrito por Nelson, (2008) la susceptibilidad de *P. americana* a *C. gloeosporioides* presenta diferencias entre variedades y cultivares de este fruto lo que se demuestra al observarse una mayor susceptibilidad en *P. americana* cv. Hass al mostrar lesiones causadas por el patógeno en tiempos más cortos en comparación con *P. americana* var. *drymifolia*.

Al realizarse los análisis de expresión del péptido PaDef en respuesta a estrés, se encontró que la expresión varía durante los tiempos analizados en ambos tratamientos, así como en los frutos analizados (**Figura 30 y 31**).

Los análisis densitométrico y estadístico mostraron que en *P. americana* var. *drymifolia* infectada con *C. gloeosporioides* presenta un aumento en la expresión durante las primeras 4 horas posteriores a la inoculación del patógeno, mientras que a las 8 horas se observó una expresión similar a la presentada a las 0 horas, mientras que a las 12 y 24 horas de tratamiento se observó un ligero incremento, el cual no muestra diferencias estadísticamente significativas con la expresión presentada a las 0 horas. Según lo descrito por Bahramnejad *et al.*, (2009) el aumento de expresión a tiempos tardíos se puede atribuir a una participación del huésped a la necrosis causada por el patógeno. En *P. americana* var. *drymifolia* se observó una ligera modificación de la apariencia del tejido aproximadamente a las 8 horas posteriores a la inoculación, así como a la aparición de lesiones a las 16 horas posteriores a inoculación de *C. gloeosporioides*. Se sabe que la inducción de defensinas no siempre se ve estimulada por el ataque de patógenos como es el caso de la defensina *PDF2.3* de *Arabidopsis thaliana*, la cual no muestra cambios en su expresión después de la infección con *Alternaria brassicicola* y en la defensina TC85327 de *Medicago truncatula* no se observan cambios en la expresión al

infectarse con *Glomus versiforme* (Hanks *et al.*, 2005; Thomma y Broekaert 1998). En respuesta a herida no se observaron modificaciones en la expresión durante los tiempos analizados (**Figura 32**), existen reportes en los que se muestra que algunas defensinas no se inducen en respuesta a herida como es la defensina *PDF1.2* de *Arabidopsis thaliana* (Manners *et al.*, 1998).

En *P. americana* cv. Hass se observó una ligera disminución en la expresión a las 4 horas posteriores a la inoculación del patógeno lo que, según Hann y Rathjen (2007), se puede atribuir a que algunos efectores pueden suprimir la resistencia basal del hospedero, por lo cual se puede ver favorecido el desarrollo de lesiones desde las 4 horas posteriores a la inoculación del patógeno. Posteriormente se observó un ligero aumento en la expresión sin diferencias estadísticamente significativas, que puede estar relacionado con el aumento de las zonas que presentan necrosis (**Figura 33**). En respuesta a herida se observó una ligera disminución en la expresión de PaDef a las 12 y 24 horas posteriores al daño mecánico lo cual coincide con la modificación de la apariencia del tejido (a partir de las 8 horas posteriores al tratamiento).

Ya que los resultados hasta este punto no eran concluyentes, se realizó el análisis de la expresión del gen *PaDef* mediante PCR-semicuantitativo. Se encontró que en frutos de *P. americana* var. *drymifolia* el comportamiento es similar en ambos tratamientos, ya que la expresión muestra ligeras modificaciones que no son estadísticamente significativas hasta las 12 horas en los frutos infectados y hasta las 8 horas en frutos con herida, mientras que a las 24 horas posteriores al tratamiento se observa un incremento en la expresión del gen, la cual coincide con la necrosis en los frutos infectados. En el caso del fruto con daño por herida se encontró que la expresión a las 24 horas es similar a la presentada a las 0 horas del tratamiento (**Figura 34**).

Estos datos muestran que la defensina PaDef no se induce en respuesta a estrés en frutos de *P. americana* var. *drymifolia*.

Por otro lado, los frutos de *P. americana* cv. Hass muestra una disminución a las 4 y 8 horas posteriores a la inoculación lo que coincide con lo observado en la

expresión del péptido, mientras que la expresión del gen *PaDef* muestra un aumento altamente significativo a las 12 horas posteriores a la inoculación del patógeno, (aumento del área de las lesiones), mientras que a las 24 horas de tratamiento la expresión es similar a la observada a las 0 horas de tratamiento. Por otro lado, en el tratamiento de herida se encontró que la expresión de *PaDef* muestra un aumento a las 8 y 12 horas posteriores al daño mecánico lo que coincide con la modificación de la apariencia del fruto para posteriormente mostrar a las 24 horas una expresión similar a la observada a las 0 horas de tratamiento (**Figura 35**).

Estos datos indican que la defensina *PaDef* no se induce en respuesta a estrés en frutos de *P. americana* cv. Hass.

Tomando en cuenta que se tienen reportes de que algunas defensinas influyen en el desarrollo de las plantas como es el caso de la defensina DEF2 la cual al sobreexpresarse en plantas de *Solanum lycopersicon*, reducen la viabilidad del polen y disminuyen el crecimiento de las plántulas en etapas tempranas (Stotz *et al.*, 2009), se puede sugerir que la defensina *PaDef* podría desempeñar algún papel en la fisiología de la planta de aguacate, diferente a la respuesta a estrés para lo que es necesario realizar más estudios con respecto a la función que desempeña *PaDef* en *P. americana* var. *drymifolia*.

11. CONCLUSIÓN

La defensina PaDef presenta una expresión constitutiva durante el desarrollo del fruto de *Persea americana* var. *drymifolia*, así como en tejidos de planta, y no se induce mesocarpo de *Persea americana* var. *drymifolia* y *Persea americana* cv. Hass en respuesta a estrés.

12. REFERENCIAS

- Andreu, D., y Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, 47, 415–433.
- Bahramnejad, B., Erickson, L. R., Chuthamat, A., y Goodwin, P. H. (2009). Differential expression of eight defensin genes of *N. benthamiana* following biotic stress, wounding, ethylene, and benzothiadiazole treatments. *Plant Cell Reports*, 28(4), 703–717. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0672-8>.
- Barrientos, A., y López, L. (1998). Historia y genética del aguacate. *Memoria Fundación Salvador Sánchez Colin*, (6), 100–121. Retrieved from www.avocadosource.com/.../CICTAMEX_1998-2001_PG_100-121.pdf.
- Baxter, A. A., Poon, I. K., y Hulett, M. D. (2017). The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell Death Discovery*, 3 16102. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.102>.
- Boller, T. y He S.Y. (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324(5928):742-744.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., y Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803–14.
- Colilla, F. J., Rocher, A., y Méndez, E. (1990). gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Letters*, 270(1–2), 191–194. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81265-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81265-P).
- Cornet, B., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M., y Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*, 3(5), 435–448. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00177-0).
- Cullis, C.A. (2004). Plant genomics and proteomics. *Jhon Wiley y Sons, Inc.* 214 p.

- De Beer, A., y Vivier, M. A. (2011). Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research Notes*, 4(1), 459. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-459>.
- De Souza, E., Cândido, M. F. S., Pinto, P. B., y Pelegrini (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*, vol.25, no.10, pp. 3290–3305.
- Do, H. M., Lee, S. C., Jung, H. W., Sohn, K. H., y Hwang, B. K. (2004). Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEF1*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*, 166(5), 1297–1305. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.01.008>.
- Dracatos, P. M., Payne, J., Di Pietro, A., Anderson, M. A., y Plummer, K. M. (2016). Plant defensins NaD1 and NaD2 induce different stress response pathways in fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091473>.
- Dziarski, R., y Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 7, 232–245.
- Eitas, T. K., y Dangl, J. L. (2010). NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 472–477. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.007.
- Epand, R. M., Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Bio- phys Acta BBA—Biomembr.* 1462: 11–28. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00198-4).
- Garcia-Olmedo, F., Rodriguez-Palenzuela, P., Molina, a, Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., y Poza-Carrión, C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peryoxynitrite in plant defence. *FEBS Letters*, 498(iii), 219–222.

- Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, V., Kogel, K. H., Oostendorp, M., Ryals, T. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8 629–643.
- Goyal, R. K., y Mattoo, A. K. (2016). Plant antimicrobial peptides. *Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents*, 111–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32949-9_5.
- Grant, J. J., y Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21–29.
- Grünewald, J., Marahiel, M.A. (2006). Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 121–146.
- Guan, L. M., Zhao, J., Scandalions, J. G. (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J.* 22 87–95.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L. C., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2013). Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/986273>.
- Hanks, J. N., Snyder, A. K., Graham, M. A., Shah, R. K., Blaylock, L. A., Harrison, M. J., y Shah, D. M. (2005). Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Mol Biol* 58:385–399.
- Hann, D. R., y Rathjen, J. P. (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 49:607–618.

- He, P., Shan L. y Sheen J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microorganism*, 9: 1385-96.
- Herrera-Diaz, A., Kovacs, I., y Lindermayr, C. (2016). Inducible Expression of the De-Novo Designed Antimicrobial Peptide SP1-1 in Tomato Confers Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *PLoS ONE* 11(10): e0164097. doi:10.1371/journal.pone.0164097.
- Hong, J. K., y Hwang, B. K. (2002). Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*), *Physiol. Plant* 114 549–558.
- Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Pérez-Torres, C. A., Albert, V. A., Mockaitis, K., Kilaru, A., y Herrera-Estrella, L. (2015). Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1775-y>.
- Jeppesen, M. G., Navratil, T., Spremulli, L. L., y Nyborg, J. (2005). Crystal structure of the bovine mitochondrial elongation factor Tu.Ts complex. *J. Biol. Chem.* 280, 5071–5081.
- Jones, J. D. G., y Dangl. J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- Lacerda, A. F., Del Sarto, R. P., Silva, M. S., de Vasconcelos, E. A. R., Coelho, R. R., dos Santos, V. O., y Grossi-de-Sa, M. F. (2016). The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Phakopsora*. *3 Biotech*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0320-7>.
- Laemmli, U. K., Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 80:575–98.
- Lamb, C., y Dixon, R. A. (1997). The oxidative Burst in plant disease resistance. *Annual Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.

- Lay, F., y Anderson, M. (2005). Defensins Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 85–101. <https://doi.org/10.2174/1389203053027575>.
- Lay, F. T., Mills, G. D., Poon, I. K. H., Cowieson, N. P., Kirby, N., Baxter, A. A., y Hulett, M. D. (2012). Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 19961–19972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331009>.
- Lay, F. T., Poon, S., McKenna, J. A., Connelly, A. A., Barbeta, B. L., McGinness, B. S., y Anderson, M. A. (2014). The C-terminal propeptide of a plant defensin confers cytoprotective and subcellular targeting functions. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-41>.
- Le, C. F., Fang, C. M., y Sekaran, S. D. (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>.
- Lee, S. C., Kim, Y. J., y Hwang, B. K., (2001). A pathogen-induced chitin-binding protein gene from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding. *Plant Cell Physiol.* 42 (2001) 1321–1330.
- López-Gómez, R., y Gómez-Lim M. A., (1992). A method for extracting intact RNA from fruit rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort Sci* 27:440–442.
- López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Ibarra-Laclette, E., Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., y Herrera-Estrella, L. (2016). Transcriptome (ESTs) of native Mexican avocado fruit is dominated by stress and innate immunity genes. *Acta Horticulturae*, 1144, 43–48. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.6>.
- Lukasik, E., y Takken, F. L., (2009). STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*; 12: 427–436.

- Maarof, E., Harun, S., Mohamed-Hussein, Z. A., Ismail, I., Sajari, R., Jumali, S., y Zainal, Z. (2011). Cloning and heterologous expression of *CDef1*, a ripening-induced defensin from *Capsicum annuum*. *Australian Journal of Crop Science*, 5(3), 271–276.
- Manners, J. M., Penninckx, I. A. M. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., Maclean, D. J., Curtis, M. D., Cammue, B. P. A., y Broekaert, W. F., (1998). The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol* 38:1071–1080.
- Marcus, J. P., Goulter, K. C., Green, J. L., Harrison, S. J., y Manners, J. M. (1997). Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *European Journal of Biochemistry*, vol. 244, no. 3, pp.743–749.
- Melo, F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V., Ary, M. B., Grossi De Sá, M. F., y Bloch, C. (2002). Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 48(2), 311–319. <https://doi.org/10.1002/prot.10142>.
- Méndez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Méndez, R., y de Haro, C. (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*, 194(2), 533–539. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15649.x>.
- Meneguetti, B. T., Machado, L. dos S., Oshiro, K. G. N., Nogueira, M. L., Carvalho, C. M. E., y Franco, O. L. (2017). Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological Tools-A review and outlook. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02136>.
- Meng, D. M., Zhao, J. F., Ling, X., Dai, H. X., Guo, Y. J., Gao, X. F., y Fan, Z. C. (2017). Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and*

- Purification*, 130, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.10.003>.
- Meyer B., Houlné, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M.-L., y Schantz, R. (1995). Fruit-Specific Expression of a Defensin-Type Gene Family in Bell Pepper. *Plant Physiol.* 112: 615-622.
- Nelson, S. (2008). Anthracnose of Avocado. *Plant Disease*, 1–6.
- Newman, M. A., Daniels, M. J., y Dow, J. M. (1995). Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense-related gene expression in *Brassica campestris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 778-780.
- Orozco-Cárdenas, M. L., y Ryan, C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 6553– 6557.
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., y Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell.* 13:179–191. [PubMed: 11158538].
- Papagianni, M., (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv.* 21: 465–499. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00077-6) PMID: 14499150.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Metraux, J. P., Manners, J. M., y Broekaert, W. F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway, *Plant Cell* 8 2309–2323.
- Peters, B. M., Shirtliff, M. E., y Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), 4–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>.
- Picart, P., Pirttilä, A. M., Raventos, D., Kristensen, H. H., y Sahl, H. G. (2012). Identification of defensin-encoding genes of *Picea glauca*: characterization of

- PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. *BMC Plant Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-180>.
- Postel, S., y Kemmerling, B., (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin Cell Dev Biol*; 20: 1025–1031.
- Rahnamaeian, M. (2011). Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signaling and Behavior*, 6(9), 1325–1332. <https://doi.org/10.4161/psb.6.9.16319>.
- Ramos, H. C., Rumbo, M., y Sirard, J.-C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12, 509–517.
- Saravanan, R. S., y Rose, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9), 2522–2532. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300789>.
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- Schwessinger, B. y Zipfel C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 389–395.
- Seo, H. H., Park, S., Park, S., Oh, B. J., Back, K., Han, O., y Kim, Y. S. (2014). Overexpression of a defensin enhances resistance to a fruit-specific anthracnose fungus in pepper. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097936>.
- Song, X., Wang, J., Wu, F., Li, X., Teng, M., y Gong, W. (2005). cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Plant Molecular Biology*, 57(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-6637-y>.
- Stotz, H. U., Spence, B., y Wang, Y. (2009). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Molecular Biology*, 71(1–2), 131–

143. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9512-z>.
- Sunwoo, J. Y., Lee, Y. K., y Hwang, B. K. (1996). Induced resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants in response to DL- β -amino-n-butyric acid. *Eur. J. Plant Pathol.* 102 (1996) 663–670.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., Francois, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., y Cammue, B. P. A. (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 3900–3905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>.
- Thomma, B. P. y Broekaert, W. F. (1998). Tissue-specific expression of plant defensin genes *PDF2.1* and *PDF2.2* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 36:533–537.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., y Ishida, I. (1997). The structure and function of a soybean β -glucan elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1029–1034.
- Vance, R. E., Isberg, R. R., y Portnoy, D. A. (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*; 6: 10–21.
- Vidales, J., Coria, V., Aguiano, J., y Alcantar, J. (2005). Control integrado de la antracnosis del aguacate. *Investigador de Campo Urapan CIRPAC INIFAP*, 1–2.
- Xoca-Orozco, L.-Á., Cuellar-Torres, E. A., González-Morales, S., Gutiérrez-Martínez, P., López-García, U., Herrera-Estrella, L., y Chacón-López, A. (2017). Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the Interaction System Fruit-Chitosan-Colletotrichum. *Frontiers in Plant Science*, 8(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00956>.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20: 10-16.

Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Plant Biol*; 12: 414–420.