

## Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante *Phytophthora cinnamomi* Rands\*

### Defense mechanisms in avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi* Rands

Petra Andrade-Hoyos<sup>1§</sup>, Eduardo Molina Gayosso<sup>2</sup>, Carlos De León<sup>1</sup>, María de la Cruz Espíndola Barquera<sup>3</sup>, Dionicio Alvarado Rosales<sup>1</sup> y Alfredo López Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Postgrado en Fitopatología. Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Tel: 01 738 724117, Ext. 150 y 151, 595 952 0200, Ext. 1740, 1681 y 1116. (pandrade@upfim.edu.mx; cdeleon@colpos.mx; dionicio@colpos.mx; lopezja@colpos.mx). <sup>2</sup>Universidad Politécnica de Puebla. Tercer Carril del Ejido "Serrano" s/n. San Mateo Cuanaalá. Juan C. Bonilla. Tel. 01 222 7746654. (eduardo.molina@uppuebla.edu.mx). <sup>3</sup>Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S. C. Ignacio Zaragoza Núm. 6 Coatepec Harinas, Estado de México. C. P. 51700. Tel. 01 723 1450160. (mespindolab@gmail.com). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: andrad@colpos.mx.

## Resumen

El estudio de la resistencia en plantas a enfermedades de la raíz, frecuentemente se evalúa a nivel macroscópico, esto es, seleccionando plantas de apariencia sana o sobrevivientes a la presión de inóculo sin considerar los mecanismos de resistencia histológica ante patógenos de raíz, como es el caso de *Phytophthora cinnamomi* causante de la "tristeza del aguacatero". El objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de micelio *P. cinnamomi* en el xilema de la raíz y la implicación en los mecanismos de resistencia-tolerancia en plantas de aguacate de cinco variedades de portainjertos. Los mecanismos estudiados fueron la formación de tilosas y el depósito de fenoles. Se observó la presencia de hifas en xilema, formación de tilosas y acumulación de fenoles en raíces provenientes de plantas muertas, con síntomas de marchitez y asintomáticas de los portainjertos Duke-7 y Thomas, Tepetl, Atlixco y Tepeyanco, previamente inoculadas con *P. cinnamomi* en condiciones de temperatura controlada en el suelo (17 y 28 °C). El contenido de micelio en el xilema de plantas muertas de Duke-7, Thomas y Tepetl a 17 °C no mostró diferencias significativas; sin embargo, a 28 °C el contenido de micelio en Duke-7 fue altamente significativo ( $p < 0.05$ ). En plantas con marchitez, la presencia de micelio fue abundante a 17 °C

## Abstract

The study of the resistance in plants to root diseases are often evaluated at a macroscopic level, that is, selecting plants with healthy appearance and surviving the inoculum pressure regardless of histological resistance mechanisms to root pathogens, as is the case of *Phytophthora cinnamomi* causing the "sadness of avocado." The aim of this study was to identify the presence of *P. cinnamomi* mycelium in the xylem of the root and the mechanisms involved in resistance-tolerance in avocado plants from five varieties of rootstocks. The studied mechanisms were tylose formation and phenolic deposits. The presence of hyphae in xylem, tylose formation and phenolic accumulation in roots from dead plants with wilt symptoms and asymptomatic of Duke-7 and Thomas, Tepetl, Atlixco and Tepeyanco rootstocks was noted which were previously inoculated with *P. cinnamomi* under controlled temperature on the soil (17 and 28 °C). Mycelium content in the xylem of dead plants Duke-7, Thomas and Tepetl to 17 °C showed no significant differences; however, at 28 °C the mycelium content in Duke-7 was highly significant ( $p < 0.05$ ). In wilted plants, the presence of mycelium was abundant in Tepetl at 17 °C, so it is considered susceptible to the pathogen. Atlixco showed low Mycelium content at

\* Recibido: septiembre de 2014  
Aceptado: enero de 2015

en Tepetl, por lo que se considera susceptible al patógeno. Atlixco mostró bajo contenido micelial a 28 °C, por lo que se considera tolerante. En plantas con síntomas de marchitez y asintomáticas, la formación de tilosas y la deposición de compuestos fenólicos contribuyeron a la defensa contra *P. cinnamomi*. Las selecciones de la raza Mexicana de Tepeyanco, Atlixco y Tepetl mostraron resistencia debido probablemente a que activaron sus mecanismos de defensa histológica estructural y química previo a la infección por *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** *Persea americana* Mill., defensa histológica, deposición de fenoles, tilosas.

## Introducción

La enfermedad conocida como "tristeza del aguacatero" es causada por el oomicete *Phytophthora cinnamomi*. El efecto principal causado por el oomicete es la pudrición de raíces con la subsiguiente muerte descendente del árbol. El control de esta enfermedad se basa generalmente en estudios epidemiológicos y manejo integrado del cultivo de aguacate. En varios países como EE. UU, Sudáfrica, España, Israel y recientemente en México la prioridad ha sido la búsqueda y selección de portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* (Zentmyer y Schieber 1987; Gallo, 1992; Gallo *et al.*, 1999; Vidales y Alcántar 1999; Téliz y Mora, 2007).

El centro de origen del aguacate es América. El subgénero *Persea* predomina desde la parte central de México, Guatemala y hasta Centroamérica. En este contexto, México es considerado como el país de mayor diversidad, donde existen 20 diferentes especies emparentadas con *Persea americana* (Barrientos y López, 2000). En las plantaciones de México sólo se utiliza el aguacate criollo *Persea americana* var. *drymifolia* raza Mexicana, debido a que los híbridos considerados como resistentes a *P. cinnamomi* no se adaptan a las condiciones edáficas y climáticas de la franja aguacatera comprendida por los estados de Michoacán, Puebla, Morelos, Nayarit y Veracruz. Asimismo, en el caso del uso de portainjertos, la mayoría de los árboles de aguacate en México están injertados sobre portainjertos de semilla procedente de árboles de la raza Mexicana de polinización libre (Newett *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2004; Bellon *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere una variación significativa en los huertos y es a partir de esta variabilidad genética que se puede encontrar resistencia al oomicete.

28 °C, which is considered tolerant. In plants with wilt symptoms and asymptomatic, tyloses formation and phenolic deposition compounds contribute to defense against *P. cinnamomi*. The selections of the Mexican race Tepeyanco, Atlixco and Tepetl showed resistance, probably because activated their structural histological mechanisms of defense and chemical prior to infection by *P. cinnamomi*.

**Keywords:** *Persea americana* Mill, histological defense, phenolic deposition, tyloses.

## Introduction

The disease known as "avocado sadness" is caused by the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. The main effect caused by the oomycete is root rot with subsequent tree dieback. Control of this disease is usually based on epidemiological studies and integrated crop management of avocado. In several countries like US, South Africa, Spain, and Israel and recently in Mexico the priority has been the search and selection of tolerant-resistant rootstocks to *P. cinnamomi* (Zentmyer and Schieber 1987; Gallo, 1992; Gallo *et al.*, 1999; Vidales and Alcántar 1999; Téliz and Mora, 2007).

The center of origin of the avocado is America. The subgenus *Persea* predominates from the central part of Mexico, Guatemala and even Central America. In this context, Mexico is considered as the country with higher diversity, where 20 different species related to *Persea americana* (Barrientos and López, 2000) exist. In plantations from Mexico is only used the creole avocado *Persea americana* var. *drymifolia* Mexican race, because hybrids are considered resistant to *P. cinnamomi* and do not adapt to soil and climatic conditions of the avocado band comprised by the states of Michoacan, Puebla, Morelos, Nayarit and Veracruz. Also, in the case of rootstocks use, most avocado trees in Mexico are grafted onto seed rootstock from trees of the Mexican race open pollinated (Newett *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2004; Bellon *et al.*, 2009). This suggests a significant variation in the orchards and it is from this genetic variability that may be possible to find resistance to oomycete.

The studies of plant resistance to root diseases are often evaluated at a macroscopic level that is, selecting plants or healthy appearance or survivor to inoculum pressure

El estudio de la resistencia en plantas a enfermedades de la raíz, frecuentemente se evalúa a nivel macroscópico, esto es, seleccionando plantas de apariencia sana o sobrevivientes a la presión de inóculo sin considerar los mecanismos de resistencia histológica ante patógenos. En el caso de las enfermedades que afectan el sistema vascular de las plantas, éstas reaccionan al ataque de patógenos produciendo estructuras y sustancias químicas que tratan de interferir en el desarrollo del mismo, como es el caso de tilosas, gomas, geles y diversos compuestos fenólicos. Éstos factores de resistencia estructural son inducidos para formar barreras y limitar al patógeno en una región del xilema con la finalidad de evitar el crecimiento del patógeno dentro del tejido de la raíz (Vleeshouwers *et al.*, 2000; Del Río *et al.*, 2002 y Hobbes, 2004; Cruz *et al.*, 2006 y Agrios, 2010). La incorporación de estos factores de resistencia mediante la selección de variedades resistentes en el cultivo de aguacate probablemente sea la estrategia más efectiva a largo plazo para disminuir los daños causados por *P. cinnamomi*.

La formación de tilosas se produce en respuesta a la infección en tejidos vasculares donde ocurre un sobrecrecimiento de los protoplastos de las células parenquimatosas adyacentes. De igual manera, dentro de estos mecanismos de defensa, se producen compuestos fenólicos llamados fitoanticipinas (ácidos cinámicos, flavonoides, isoflavonoides, deoxiantocianinas, estilbenos, cumarinas, cromonas) alrededor de las células los cuales actúan de forma pasiva reforzando la pared celular e inhibiendo el crecimiento de hifas (Scalbert, 1991; Schlosser, 1994; Vleeshouwers *et al.*, 2000).

La selección de portainjertos tolerantes-resistentes a la pudrición de raíz y su relación con el estudio de mecanismos de defensa histológica a *P. cinnamomi* no ha sido una prioridad en el cultivo de aguacate. En estudios histológicos en otras especies, como en el caso de la papa, afectada por *Fusarium oxysporum*, alfalfa por *Verticillium albo-atrum*, olmo por *verticillium*, vid afectada por *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium inflatipes* y en el cultivo de chile con *Phytophthora capsici* y *Fusarium* sp., se ha observado que en estos patosistemas, las plantas tienen la capacidad de reaccionar ante una invasión microbiana desarrollando mecanismos de defensa como la formación de tilosas y síntesis de compuestos fenólicos para detener el avance del patógeno, y al final algunas plantas muestran susceptibilidad al patógeno debido a que superan las barreras de defensa producidas por la planta (Sepulveda *et*

regardless histological mechanisms of resistance to pathogens. In the case of diseases that affect the vascular system of plants, these react to pathogens producing structures and chemicals that try to interfere with the development of the same, such as tylose, gums, gels and various phenolic compounds. These factors of structural resistance are induced to form barriers and restrict the pathogen in a region of the xylem in order to prevent the growth of the pathogen within root tissue (Vleeshouwers *et al.*, 2000; Del Río *et al.*, 2002; Hobbes, 2004; Cruz *et al.*, 2006 and Agrios, 2010). Incorporating these resistance factors through selection of resistant varieties in growing avocados is probably the most effective long-term strategy to reduce the damage caused by *P. cinnamomi*.

Tyloses formation is produced in response to infection in vascular tissues where an overgrowth of protoplasts from adjacent parenchymal cells occurs. Similarly, within these defense mechanisms, phenolic compounds called phytoanticipins are produced (cinnamic acids, flavonoids, isoflavonoids, deoxianthocyanins, stilbenes, coumarins, chromones) around cells which act passively reinforcing cell wall and inhibiting hyphal growth (Scalbert, 1991; Schlosser, 1994; Vleeshouwers *et al.*, 2000).

Selection of tolerant-resistant rootstocks to root rot and its relation to the study of histological defense mechanisms to *P. cinnamomi* has not been a priority in avocado. Histological studies in other species, as in the case of potatoes, affected by *Fusarium oxysporum*, alfalfa by *Verticillium albo-atrum*, elm by *verticillium*, vid by *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* and in pepper by *Phytophthora capsici* and *Fusarium* sp.; It has been observed that in these pathosystems, plants have the capacity to react to microbial invasion developing defense mechanisms such as the formation of tyloses and synthesis of phenolic compounds to stop the spread of the pathogen, and finally some plants show susceptibility to the pathogen due to the overcome of defense barriers produced by the plant (Sepulveda *et al.*, 1979; Grant and Byrt, 1984; Vleeshouwers *et al.*, 2000; Nicks and Lindhout, 2004; Cruz *et al.*, 2006). Thus the aim of this work was to identify the presence of *P. cinnamomi* mycelium in the xylem of the root and its involvement in the formation of tyloses and phenolic deposition as histological defense mechanisms in avocado rootstocks.

*al.*, 1979; Grant y Byrt, 1984; Vleeshouwers *et al.*, 2000; Nicks y Lindhout, 2004; Cruz *et al.*, 2006). Así, el objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de micelio de *P. cinnamomi* en el xilema de la raíz y su implicación en la formación de tilosas y depósito de fenoles como mecanismos de defensa histológica en portainjertos de aguacate.

## Materiales y métodos

### Muestreo de raíces y preparación de las muestras histopatológicas

La inoculación de *P. cinnamomi* y la selección de plantas tolerantes-resistentes a la enfermedad se realizó siguiendo una modificación de la técnica de tanques de agua con temperatura controlada utilizada por Walker (1957). Los tanques utilizados de 1.5 \* 1.10 m conteniendo agua destilada se mantuvieron a temperaturas controladas a 17 y 28 °C y circulación continua de aire. Las plantas de aguacate, diez por cada variedad y de uno a dos años de edad, de los portainjertos comerciales Duke-7 y Thomas, y de los genotipos Tepetl, Tepeyanco y Atlxco de raza Mexicana fueron cultivados en contenedores de polietileno negro de 14 cm de diámetro y 30 cm de altura con suelo estéril, introducidos en los tanques e inoculados con 250 mL/contenedor de fragmentos de 2.5 \* 10<sup>3</sup> mL de fragmentos de micelio de *P. cinnamomi*. Tanques con las mismas características en número y crecimiento de plantas, además de temperatura, fueron dejadas sin inocular como testigos.

Cuando las primeras plantas mostraron síntomas avanzados de marchitamiento se tomaron muestras al azar de raíces adventicias con síntomas de pudrición de una planta muerta, dos plantas con síntomas de marchitez y dos plantas asintomáticas (aproximadamente 5 gramos por planta), además de dos plantas testigo (sin inocular) por cada uno de los genotipos. Posteriormente, para la realización de los cortes histológicos, las raíces colectadas se lavaron con agua destilada y se cortaron segmentos de 1 cm de longitud. Las muestras colectadas se colocaron en solución FAA (formaldehído: 100 mL, ácido acético glacial: 50 mL, etanol: 500 mL y agua destilada: 350 mL) durante 24 h a temperatura ambiente. Se lavaron con agua y se colocaron para deshidratar en etanol a 50, 70, 96 y 100%, durante 3 horas en cada disolución.

Posteriormente, se transfirieron a diluciones 3:1, 1:1 y 1:3 de alcohol-xileno y xileno a 100% durante 72 h en cada dilución. Al término de este tiempo, las muestras se retiraron

## Materials and methods

### Root sampling and preparation of histopathological samples

Inoculation of *P. cinnamomi* and the selection of tolerant-resistant plants to diseases were performed by a modification of the technique of water tank with controlled temperature used by Walker (1957). Tanks used 1.5 \* 1.10 m containing distilled water were kept at controlled temperatures of 17 and 28 °C and continuous circulation of air. The avocado plants, ten per each variety and one of two years old, from commercial rootstocks Duke-7 and Thomas and Tepetl, Tepeyanco and Atlxco genotypes were grown in containers of black polyethylene with 14 cm in diameter and 30 cm height with sterile soil, introduced in the tank and inoculated with 250 mL / fragments container of 2.5 \* 10<sup>3</sup> mycelial fragments of *P. cinnamomi*. Tanks with the same characteristics in number and growth of plants, in addition to temperature, were left uninoculated as controls.

When the first plants showed advanced wilt symptoms, samples of adventitious root showing root rot symptoms of a dead plant, two plants with wilt symptoms and two asymptomatic plants (about 5 grams per plant), and two plants (uninoculated) for each of the genotypes were taken randomly. Subsequently, to carry out the histological sections, the collected roots were washed with distilled water and segments of 1 cm length were cut. The collected samples were placed in FAA (formaldehyde: 100 mL, glacial acetic acid: 50 mL, ethanol: 500 mL distilled water: 350 mL) solution for 24 h at room temperature; washed with water and placed for drying in ethanol at 50, 70, 96 and 100%, for 3 hours in each solution.

Subsequently, were transferred to dilutions 3:1, 1:1 and 1:3 of alcohol-xylene and xylene at 100% for 72 h in each dilution. At the end of this time, samples were removed and embedded in melted paraffin (Paraplast SIGMA<sup>®</sup>) for 24 h at ± 60 °C (López *et al.*, 2005) in an automatic tissue processor Tissue-Tek R II, model 4640-BR<sup>®</sup> (Sakura Finetechnical Co., LTD Tokyo, Japan). Finally, samples were extracted from the processor and poured the melted paraffin into cubes of paper (1 cm wide by 1.5 cm long) to embed the root tissue and allowed to cool to solidify. Paraffin cubes with tissue were mounted on wood blocks and proceeded to perform cuts of 15 µ thickness with a rotary microtome (Spencer 820<sup>®</sup>). The cuts were suspended in water with gelatin bacteriological grade at 55 °C and mounted on slides to dry at room temperature.

y embebieron en parafina fundida (Paraplast SIGMA®) por 24 h a  $\pm 60$  °C (López *et al.* 2005) en un procesador automático de tejidos Tissue-Tek R II, modelo 4640-BR® (Sakura Finetechnical Co., LTD Tokio, Japan). Finalmente, se extrajeron del procesador, se vertió parafina fundida en cubos de papel (1 cm de ancho por 1.5 cm de largo) para embeber el tejido radical y se dejó enfriar hasta solidificarse. Los cubos de parafina con el tejido se montaron en cubos de madera y se procedió a realizar cortes de 15  $\mu$  de grosor con un micrótopo rotatorio (Spencer 820®). Los cortes se suspendieron en agua con gretina grado bacteriológico a 55 °C y se montaron en portaobjetos hasta dejarlos secar a temperatura ambiente.

### Tinción safranina-verde rápido

La parafina se removió de los portaobjetos colocándolos en estufa a 50 °C por 20 min. Posteriormente, los cortes se pasaron por tres cambios de xileno a 100% por tres minutos cada uno y se hidrataron en dos cambios de alcohol a 96 y 100% por tres minutos cada uno. Al final, las muestras se tiñeron con la técnica de doble safranina y verde rápido Fast Green FCF (López *et al.*, 2005). Las muestras se montaron en resina sintética (SIGMA®) y se observaron al microscopio de luz a 40 X (VE-B6 Velab®) para identificar la presencia de micelio, tilosas y depósito de compuestos fenólicos en los tejidos radicales.

### Evaluación de variables histológicas

La presencia de micelio, tilosas y el depósito de compuestos fenólicos de color rojizo con paredes lignificadas se determinaron visualmente como ausencia o presencia. Para la evaluación microscópica de los cortes histológicos se consideraron 10 portaobjetos (repeticiones) por cada uno de los cinco genotipos que presentaron plantas muertas, con síntomas de marchitez y plantas asintomáticas inoculadas con *P. cinnamomi* y sin inocular con temperaturas de 17 y 28 °C. Se revisaron 5 cortes de cada una de las 10 repeticiones y se observaron 5 campos con el objetivo 40 X (250 observaciones en total). Los datos obtenidos se arreglaron de manera factorial (5 \* 2) para plantas muertas, asintomáticas y con marchitez, en donde el nivel 5 correspondió a los 5 genotipos y el 2 a las temperaturas de 17 y 28 °C. Se realizó análisis de varianza a los datos obtenidos y comparación de medias con la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System V 9.0; SAS Institute, 2001).

### Safranin- fast green staining

The paraffin was removed from the slides, placing them in an oven at 50 °C for 20 min then sections were passed through three changes of xylene at 100% for three minutes each, and hydrated in two changes of alcohol at 96 and 100% for three minutes each. Finally, the samples were stained with technique double safranin and fast green, Fast Green FCF (López *et al.*, 2005). The samples were mounted in synthetic resin (SIGMA®) and observed under a light microscope at 40 X (VE-B6 Velab®) to identify the presence of mycelium, tylose and phenolic compounds in root tissues.

### Evaluation of histological variables

The presence of mycelium, tyloses and deposit of reddish phenolic compounds with lignified walls visually were determined visually as absence or presence. For microscopic evaluation of histological sections 10 slides (replicates) were considered for each of the five genotypes that showed dead plants having wilt symptoms and asymptomatic plants inoculated with *P. cinnamomi* and uninoculated with temperatures of 17 and 28 °C. 5 sections of each of the 10 replicate were reviewed and 5 fields with 40 X objective (250 observations in total) were observed. The data were arranged in factorial (5 \* 2) for dead, asymptomatic and wilting plants, where level 5 corresponded to the 5 genotypes and 2 to temperatures of 17 and 28 °C. An analysis of variance of the data obtained and means comparison using Duncan's test ( $p < 0.05$ ) was performed. The statistical package SAS (Statistical Analysis System V 9.0; SAS Institute, 2001) was used.

## Results and discussion

In histological sections of roots of avocado genotypes previously infected with oomycete *P. cinnamomi*, infection and activation of defense mechanisms was observed. The presence of *P. cinnamomi* mycelium, tyloses and phenolic compounds deposit both in dead plants, as with wilt symptoms and in asymptomatic plants at 17 and 28 °C (Table 1, 2 and 3) was detected ( $p < 0.05$ ) with a high coefficient of variation, indicative of genetic variability of the materials evaluated. On the contrary, in roots of rootstocks control (uninoculated) at both temperatures tested 17 and 28 °C, the presence of mycelium of *P. cinnamomi*, tylose or phenolics

## Resultados y discusión

En los cortes histológicos de raíces de los genotipos de aguacate previamente infectados con el oomicete *P. cinnamomi*, se observó infección y activación de mecanismos de defensa. Se detectó la presencia de micelio de *P. cinnamomi*, tilosas y depósito de compuestos fenólicos tanto en plantas muertas, como con síntomas de marchitez y en plantas asintomáticas a 17 y 28 °C (Cuadro 1, 2 y 3), ( $p < 0.05$ ) con un coeficiente de variación elevado, indicativo de la variabilidad genética de los materiales evaluados. Muy al contrario, en las raíces de portainjertos testigo (sin inocular) a las dos temperaturas probadas, 17 y 28 °C, no se detectó la presencia de micelio de *P. cinnamomi*, tilosas ni compuestos fenólicos. Lo anterior, pone de manifiesto que la presencia de tilosas y depósitos de compuestos fenólicos son mecanismos de defensa que, en este caso, están en función de la presencia o ausencia de *P. cinnamomi*.

### Presencia de micelio en plantas muertas

En las raíces de los portainjertos Duke-7, y Thomas, y del genotipo Tepetl mantenidas a 17 °C, el porcentaje de micelio presente en el xilema de raíces adventicias (1 a 4 mm. de diámetro aproximadamente) no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, a 28 °C Tepetl y Thomas, tuvieron un porcentaje de presencia de micelio en el xilema significativamente menor en comparación con Duke-7, que presentó mayor contenido de micelio (13.92%). Esto sugiere que la cantidad de micelio en el xilema de raíces de los portainjertos muertos está relacionado con la infección del oomicete y sobre todo por la incapacidad de las plantas para contrarrestar el efecto de invasión del micelio, la infección superó las barreras estructurales de defensa (Cuadro 1).

La temperatura y alta humedad del suelo en las que se mantuvieron las plantas fueron determinantes para que el oomicete causara infección y se facilitara el establecimiento, colonización y progreso del patógeno en el sistema radical y finalmente culminar con la muerte de plantas susceptibles. El micelio logró penetrar las células adyacentes al xilema hasta llegar al xilema y células parenquimatosas, superando las barreras estructurales de resistencia como lo son las tilosas, presentándose síntomas de marchitamiento y por último la muerte de las plantas (Grant y Byrt, 1984; Agrios, 2010).

compounds were not detected. This shows that the presences of tyloses and phenolic deposits are defense mechanisms which, in this case, are based on the presence or absence of *P. cinnamomi*.

### Presence of mycelium in dead plants

In the roots of rootstocks Duke-7 and Thomas and Tepetl genotype kept at 17 °C, the percentage of mycelia present in the xylem of adventitious roots (1 to 4 mm diameter) did not show statistically significant differences. However, at 28 °C Tepetl and Thomas, had a percentage of mycelia presence in the xylem significantly lower compared to Duke-7, which had a higher content of mycelium (13.92%). This suggests that the amount of mycelium in the xylem of roots from dead rootstocks is linked to oomycete infection and especially by the inability of plants to counteract the effect of mycelial invasion, the infection exceeded structural defense barriers (Table 1).

Temperature and high soil moisture under which the plants were kept, were crucial for the oomycete to cause infection and facilitating establishment, colonization and progress of pathogen in the root system and finally with the death of susceptible plants. The mycelium was able to penetrate adjacent cells to the xylem to reach the xylem and parenchyma cells, overcoming structural barriers of resistance such as tyloses, showing symptoms of wilting and finally death of plants (Grant and Byrt, 1984; Agrios, 2010).

### Presence of mycelium in plants with wilt symptoms

In Tepetl genotype, the presence of mycelium in the xylem of plants under conditions of temperature in the soil at 17 °C was significantly higher (19.04%) compared to Thomas and Duke-7 (3.12 and 5.76%), so are considered histologically susceptible for showing higher colonization of *P. cinnamomi* hyphae at a microscopic level. However, this same genotype at 28 °C showed 7.92% of mycelium in the xylem, being less than Thomas ( $p < 0.05$ ). The high and low mycelium content in the xylem of Tepetl genotype 17 and 28 °C respectively, could be due to genetic variability, resulting in susceptibility and some tolerance to prevent vascular invasion by this pathogen.

The Thomas rootstock showed wilt symptoms with less mycelial growth (3.12%) in the xylem at 17 °C; however, at 28 °C showed greater mycelial growth (15.12%) compared to Tepetl, Tepeyanco and Atlixco ( $p < 0.05$ ) genotypes.

**Cuadro 1. Presencia de micelio de *P. cinnamomi* en raíces de plantas de aguacate muertas, con síntomas de marchitez y asintomáticos a dos temperaturas.**

**Table 1. Presence of *P. cinnamomi* mycelium in roots of dead plants of avocado with wilt symptoms and asymptomatic at two temperatures.**

Genotipos	Contenido de micelio en raíz (%)					
	Muertos 17 °C	28 °C	Con marchitez 17 °C	28 °C	Asintomáticos 17 °C	28 °C
Duke-7	9.84 a*	13.92 a	5.76 b	‡-	‡-	3.68 bc
Thomas	7.76 a	3.44 b	3.12 b	15.12 a	3.92 b	0.08 c
Tepetl	6.32 a	3.2 b	19.04 a	7.92 b	2.56 b	11.68 a
Tepeyanco	‡-	‡-	‡-	2.08 c	8.08 a	6.88 ab
Atlixco	‡-	‡-	‡-	8.4 b	5.44 ab	7.2 ab

\*Valores de medias con la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente (Duncan  $\alpha=0.05$ ). †-Sin evaluación por ausencia de plantas muertas y con marchitez.

‡Sin evaluación por ausencia de plantas con marchitez y asintomáticas.

**Presencia de micelio en plantas con síntomas de marchitez**

En el genotipo Tepetl, la presencia de micelio en el xilema de las plantas en condiciones de temperatura en el suelo a 17 °C fue significativamente mayor (19.04%) en comparación con Thomas y Duke-7 (3.12 y 5.76%), por lo que se considera susceptible histológicamente al observarse mayor colonización de hifas de *P. cinnamomi* a nivel microscópico. Sin embargo, este mismo genotipo a 28 °C presentó 7.92% de micelio en el xilema, siendo menor a Thomas ( $p < 0.05$ ). El alto y bajo contenido de micelio en el xilema en el genotipo Tepetl a 17 y 28 °C respectivamente, posiblemente se debe a la variabilidad genética que resulta generalmente en susceptibilidad y cierta tolerancia al impedir la invasión vascular por este patógeno.

El portainjerto Thomas presentó síntomas de marchitamiento con un menor desarrollo micelial (3.12%) en el xilema a 17 °C; sin embargo, a 28 °C mostró mayor desarrollo micelial (15.12%) en comparación con los genotipos Tepetl, Tepeyanco y Atlixco ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, el genotipo Tepeyanco presentó el menor contenido de micelio en el xilema (Cuadro 1), lo que sugiere que el alto o bajo porcentaje de micelio en el xilema es capaz de causar síntomas de marchitez y alteraciones microscópicas en la raíz de éste genotipo; bajo porcentaje que es debido a la formación de barreras físicas y contenido de compuestos antifúngicos (tilosas y polifenoles, respectivamente) como defensa de la planta ante la presencia del oomicete. Se sugiere que esta respuesta, bajo porcentaje de micelio y síntomas de marchitez, se debe a la habilidad del patógeno para avanzar sistémicamente a lo largo de la raíz y a la susceptibilidad del hospedante, coincidiendo con lo observado en raíces

Furthermore, Tepeyanco genotype had the lowest mycelium content in xylem (Table 1), suggesting that the high or low percentage of mycelium in the xylem is capable to cause symptoms of wilt and microscopic alterations in the root of this genotype; the low percentage is due to the formation of physical barriers and content of antifungal compounds (tyloses and polyphenols, respectively) as plant defense in the presence of the oomycete. It is suggested that this response, low percentage of mycelium and wilt symptoms is due to the ability of the pathogen to move systemically throughout the root and host susceptibility, coinciding with that observed in roots of *Ulmus minor* Mill, *Vitis vinifera* L. and *Capsicum* sp., which showed different levels of susceptibility and tolerance to systemic diseases caused by *Verticillium* sp., *Fusarium* sp. and *Ophiostoma novo-ulmi* (Sepúlveda *et al.*, 1979; Grant and Byrt, 1984; Vleeshouwers *et al.*, 2000; Niksy Lindhout, 2004), respectively.

The Tepetl and Atlixco genotypes showed similar mycelial content at 28 °C, therefore, at a histological level could be considered as tolerant to *P. cinnamomi*. Moreover, Tepeyanco had a significant percentage decrease of mycelial growth in the xylem at 28 °C, indicating that this may be a resistant rootstock to oomycete by activating their defense mechanisms preventing the advance of the pathogen (Table 1). While at 28 °C a greater amount of mycelium was detected, indicating that the root at this temperature allowed the interaction with the pathogen, causing infection to the root system.

**Presence of mycelia in asymptomatic plants**

The asymptomatic plants of Tepeyanco and Atlixco genotypes of Mexican race had the highest percentage of mycelial growth in root xylem when treated at 17 and

de *Ulmus minor* Mill, *Vitis vinifera* L. y *Capsicum* sp., que mostraron diferentes niveles de susceptibilidad y tolerancia a las enfermedades sistémicas causadas por *Verticillium* sp., *Fusarium* sp. y *Ophiostoma novo-ulmi* (Sepúlveda *et al.*, 1979; Grant y Byrt, 1984; Vleeshouwers *et al.*, 2000; Niksy Lindhout, 2004), respectivamente.

Los genotipos Tepetl y Atlixco mostraron contenido micelial similar a 28 °C, por lo que, a nivel histológico pueden considerarse como tolerantes a *P. cinnamomi*. Por otra parte, Tepeyanco obtuvo una significativa disminución porcentual de desarrollo micelial en el xilema a 28 °C, indicando que éste puede ser un portainjerto resistente al oomicete al activar sus mecanismos de defensa impidiendo el avance del patógeno (Cuadro 1). Aunque a 28 °C se detectó una mayor cantidad de micelio lo que indicó que la raíz en esta temperatura permitió la interacción con el patógeno y causó infección del sistema radical.

### Presencia de micelio en plantas asintomáticas

Los plantas asintomáticas de los genotipos Tepeyanco y Atlixco, de la raza Mexicana, presentaron el mayor porcentaje de desarrollo micelial en el xilema de la raíz cuando fueron tratados a 17 y 28 °C. De acuerdo con los resultados macroscópicos (plantas con síntomas, sin síntomas y muertas) obtenidos a 28 °C, estos genotipos tuvieron resistencia al oomicete al presentar mayor número de plantas asintomáticas, ausencia de plantas muertas y solamente 10% de plantas con síntomas de marchitez  $p < 0.05$  (Andrade *et al.*, 2012). De acuerdo con García y Fraile (1996), el daño causado por el patógeno puede resultar en una alteración microscópica sin presentar síntomas o alteraciones macroscópicas, como se observó en plantas asintomáticas, que no desarrollaron síntomas de marchitamiento causado por *P. cinnamomi*. De acuerdo a la definición de resistencia de plantas a enfermedades, se requiere de plantas con atributos genéticos que regulen y permitan restringir el crecimiento del patógeno y, consecuentemente el desarrollo de la enfermedad en el hospedante (Nicks *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2006).

Las plantas asintomáticas del portainjerto comercial Thomas y del genotipo de la selección Tepetl presentaron poco desarrollo micelial a 17 °C. En comparación, Tepetl a 28 °C tuvo el mayor contenido de micelio. En la selección para resistencia a *P. cinnamomi* a 28 °C se observó una disminución del desarrollo micelial en las plantas asintomáticas de los portainjertos Thomas y Duke-7 en comparación con las plantas asintomáticas de los genotipos restantes ( $p < 0.05$ ); sin embargo, estos genotipos presentaron el menor número

28 °C. According to the macroscopic findings (plants with symptoms, without symptoms and dead) obtained at 28 °C, these genotypes had resistance to oomycete showing a greater number of asymptomatic plants, absence of dead plants and only 10% of plants with wilt symptoms  $p < 0.05$  (Andrade *et al.*, 2012). According to García and Fraile (1996), the damage caused by the pathogen may result in a microscopic alteration without showing symptoms or macroscopic alterations, as observed in asymptomatic plants that did not develop wilt symptoms caused by *P. cinnamomi*. According to the definition of plant resistance to diseases, it requires plants with genetic attributes governing and allowing to reduce the growth of the pathogen and hence the development of the disease in the host (Nicks *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2006).

Asymptomatic plants from commercial rootstock Thomas and the genotype from Tepetl selection showed little mycelial growth at 17 °C. In comparison, Tepetl at 28 °C had the highest content of mycelium. In selecting for resistance to *P. cinnamomi* at 28 °C a decrease of mycelial growth in asymptomatic plants from Thomas and Duke-7 rootstocks in comparison to asymptomatic plants from the remaining genotypes ( $p < 0.05$ ) was observed; however, these genotypes had the lowest number of asymptomatic plants and a large number of dead plants with wilt symptoms, so at a histological level this can be considered with moderate tolerance  $p < 0.05$  (Andrade *et al.*, 2012).

When wilt symptoms and mortality were evaluated in the Mexican race materials of Atlixco and Tepeyanco, this showed more than 90% of asymptomatic plants and when evaluating at a histopathological level was detected the inter and intracellular advance of *P. cinnamomi* hyphae (Figure 1 A and B). These results suggest that the asymptomatic plants restrict the advance of mycelium, so that Tepeyanco and Atlixco Mexican race could be promising rootstocks due to its capability to prevent the invasion and mycelial advance of oomycete in root tissue. This is possibly due to the timely activation of the mechanisms of structural and chemical resistance considered as the most effective in reducing the infection of the pathogen (Ouellette and Rioux, 1992; Hobbes, 2004).

### Presence of tyloses in dead plants

In dead plants of Thomas and Duke-7 rootstocks, reported as tolerant to *P. cinnamomi* (Kremer and Kohne, 2007), a greater number of tyloses was found in the roots at 17 °C, while at 28 °C in Tepetl and Duke-7, tyloses were not observed in the xylem. The highest percentage of tyloses was observed in Thomas with 1.12%  $p < 0.05$  (Table 2).



de plantas asintomáticas y un número importante de plantas muertas y con síntomas de marchitez, por lo que, a nivel histológico pueden considerarse con tolerancia moderada  $p < 0.05$  (Andrade *et al.*, 2012).

Cuando se evaluaron los síntomas de marchitez y mortalidad en materiales de la raza Mexicana Atlixco y Tepeyanco, éstos mostraron más de 90% de plantas asintomáticas y al evaluar a nivel histopatológico se detectó el avance inter e intracelular de las hifas de *P. cinnamomi* (Figura 1 A y B). Éstos resultados sugieren que las plantas asintomáticas restringen el avance del micelio, por lo que, Tepeyanco y Atlixco de la raza Mexicana, podrían ser portainjertos promisorios debido a su capacidad de impedir la invasión y avance micelial del oomicete en el tejido de la raíz. Esto, posiblemente se debe a la activación oportuna de los mecanismos de resistencia estructural y química considerados como los más eficaces para disminuir la infección del patógeno (Ouellette y Rioux, 1992; Hobbes, 2004).

### Presencia de tilosas en plantas muertas

En las plantas muertas de los portainjertos Thomas y Duke-7, reportados como tolerantes a *P. cinnamomi* (Kremer y Kohne, 2007), se encontró mayor cantidad de tilosas en la raíz a 17 °C, mientras que a 28 °C en Tepetl y Duke-7 no se observaron tilosas en el xilema. El mayor porcentaje de tilosas se observó en Thomas con 1.12%  $p < 0.05$  (Cuadro 2).

### Cuadro 2. Presencia de tilosas en el xilema de genotipos de aguacate muertos, con marchitez y asintomáticos cultivados a dos temperaturas e infectados con *P. cinnamomi*.

Table 2. Presence of tyloses in the xylem of dead avocado genotypes, with wilt and asymptomatic grown at two temperatures and infected with *P. cinnamomi*.

Genotipos	Contenido de tilosas (%)					
	Muertos		Con marchitez		Asintomáticos	
	17 °C	28 °C	17 °C	28 °C	17 °C	28 °C
Duke-7	4 ab*	0.08 b	4.4 a	-‡	-‡	2.96 b
Thomas	4.8 a	1.12 a	0 b	4 b	1.6 b	0.56 c
Tepetl	0.08 b	0 b	1.44 b	2.56 b	14.72 a	13.44 a
Tepeyanco	†-	†-	†-	13.52 a	3.76 b	2.24 b
Atlixco	†-	†-	†-	7.52 ab	1.52 b	11.92 a

\*Valores de medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Duncan  $\alpha = 0.05$ ). †-Sin evaluación por ausencia de plantas muertas y con marchitez. ‡Sin evaluación por ausencia de plantas con marchitez y asintomáticas.

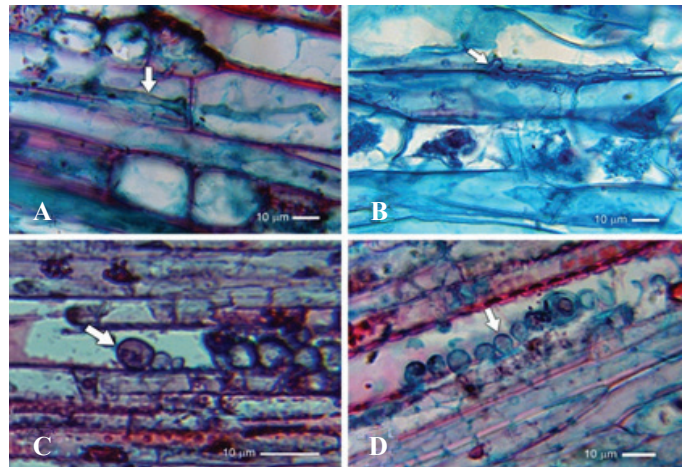


Figura 1. Micrografías de corte longitudinal de raíz tomadas a 40 X con microscopio de luz. Las flechas indican: A) genotipo de Atlixco, raza Mexicana, con crecimiento del micelio intercelular; B) genotipo de Tepeyanco, raza Mexicana, con micelio intracelular; C) portainjerto Thomas asintomático a 28 °C con presencia de tilosas maduras; y D) genotipo de Atlixco asintomático a 28 °C con presencia de tilosas inmaduras.

Figure 1. Micrographs of longitudinal sections from root taken at 40 X with light microscope. Arrows indicate: A) genotype of Atlixco, Mexican race, with intercellular mycelial growth; B) tepeyanco genotype, Mexican race, with intracellular mycelium; C) asymptomatic rootstock Thomas at 28 °C with presence of mature tyloses; and D) asymptomatic Atlixco genotype at 28 °C with presence of immature tyloses.

En las plantas muertas, el patógeno superó las estructuras de defensa penetrando las tilosas del xilema, mostrando la destrucción del tejido celular causado por la enfermedad, por lo que se deduce que las plantas son susceptibles porque no fueron suficientes los mecanismos de defensa contra *P. cinnamomi*. Respecto a la formación de tilosas, Dimond (1955), Misaghi *et al.* (1978) y Cruz *et al.* (2006) señalan que la sintomatología de marchitamiento se debe principalmente a que el micelio supera las barreras estructurales de defensa avanzando inter e intracelularmente, induciendo hidrólisis de la pared celular al causar la destrucción de raíces e impedir la absorción de agua, nutrientes y finalmente la muerte de las plantas.

### Presencia de tilosas en plantas con síntomas de marchitez

Los portainjertos comerciales conocidos por su resistencia a síntomas de marchitamiento (Kremer y Kohne, 2007), como Duke-7 mostró un elevado porcentaje (4.40%) de tilosas a 17 °C, mientras que en Thomas hubo ausencia total de tilosas en el xilema (Cuadro 2). El genotipo Tepetl presentó entre 1.44 y 2.56% de tilosas en comparación con Thomas con 0 y 4% a 17 y 28 °C, respectivamente. El porcentaje más elevado de tilosas a 28 °C se observó en la raza Mexicana de Atlixco y Tepeyanco (Cuadro 2), por lo que estos genotipos pueden ser considerados como resistentes a la marchitez causada por *P. cinnamomi*. Las tilosas son producidas para limitar la invasión del micelio, de aquí que no todas las variedades tienen la capacidad de producir una o más tilosas como mecanismo de defensa para impedir el avance del micelio.

### Presencia de tilosas en plantas asintomáticas

La presencia de tilosas en los genotipos de aguacate asintomáticos fue estadísticamente diferente  $p < 0.05$  (Cuadro 2). El genotipo Tepetl presentó mayor porcentaje de tilosas a 17 y 28 °C, mientras que la variedad Atlixco presentó mayor contenido de tilosas en el xilema sólo a 28 °C (Cuadro 2, Figura 1 D). La menor formación de tilosas en el xilema a 17 °C la presentaron los portainjertos Thomas, Atlixco y Tepeyanco, mientras que a 28 °C el porcentaje más bajo se observó en Thomas (Figura 1 C). Por su parte, Cruz *et al.* (2006) señalan que en algunas variedades, las tilosas se forman cuando el patógeno se encuentra en raíces jóvenes y tienen la función de obstruir el paso del patógeno, bloqueando su avance y permitiendo que las plantas permanezcan libres del patógeno, a lo cual este comportamiento se atribuye la tolerancia-resistencia de los genotipos de Tepeyanco y Atlixco.

In the dead plants, the pathogen overcame defense structures penetrating the xylem tyloses, showing cellular tissue destruction caused by the disease, so it is deduced that plants are susceptible because their defense mechanisms against *P. cinnamomi* were not enough. Regarding the formation of tyloses, Dimond (1955), Misaghi *et al.* (1978) and Cruz *et al.* (2006) note that the wilt symptoms are mainly due to the mycelium overcomes structural defense barriers advancing inter and intracellularly, inducing hydrolysis of the cell wall causing the destruction of roots and prevent the absorption of water, nutrients and finally plant death.

### Presence of tyloses in plants with wilt symptoms

Commercial rootstocks are known for its resistance to wilting symptoms (Kremer and Kohne, 2007), as Duke-7 showed a high percentage (4.40%) of tyloses at 17 °C, while in Thomas had complete absence of tyloses in xylem (Table 2). The Tepetl genotype showed between 1.44 and 2.56% tyloses in comparison to Thomas with 0 and 4% at 17 and 28 °C, respectively. The highest percentage of Tyloses at 28 °C was observed in Atlixco and Tepeyanco Mexican race (Table 2), therefore these genotypes can be considered as resistant to wilt caused by *P. cinnamomi*. Tyloses are produced to limit the invasion of mycelium hence not all varieties have the capability to produce one or more tyloses as a defense mechanism to prevent the advance of the mycelium.

### Presence of tyloses in asymptomatic plants

The presence of tyloses in asymptomatic avocado genotypes was statistically different  $p < 0.05$  (Table 2). Tepetl showed the highest percentage of tylose at 17 and 28 °C, while Atlixco showed higher tylose content in the xylem, only 28 °C (Table 2, Figure 1 D). The lower formation of tyloses in the xylem at 17 °C was for Thomas, Atlixco and Tepeyanco rootstocks, while at 28 °C the lowest percentage was found in Thomas (Figure 1 C). Meanwhile, Cruz *et al.* (2006) note that in some varieties, tyloses are formed when the pathogen is in young roots and have the function to block the passage of the pathogen, blocking their advance and allowing plants to remain free of the pathogen, to which this behavior is attributed to tolerance-resistance of Tepeyanco and Atlixco genotypes.

### Phenolic compounds in dead plants

The increase of phenolic compounds is a response mechanism in the presence of mycelium (Cruz *et al.*, 2006). The deposit of these phenols is closely related to

### Compuestos fenólicos en plantas muertas

El incremento de compuestos fenólicos es un mecanismo de respuesta ante la presencia de micelio (Cruz *et al.*, 2006). El depósito de estos fenoles está estrechamente relacionado con la defensa histológica frente a la severidad de la infección y supervivencia de la planta ante la invasión del patógeno en plantas muertas (DelRío *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una mayor acumulación de compuestos fenólicos en células colapsadas en ambas temperaturas. Los compuestos fenólicos encontrados por Bekker *et al.* (2007) en raíces de árboles de aguacate infectados con *P. cinnamomi* fueron el ácido 3,4-hidroxibenzoico y el ácido vanilínico, compuestos que al contacto con el patógeno funcionan como barreras físicas y confieren a la pared celular cierta resistencia a la penetración de *P. cinnamomi*.

En los cortes histológicos, otra característica observada como mecanismo de defensa química en plantas muertas frente a la infección causada por *P. cinnamomi*, fue la acumulación de compuestos fenólicos. El mayor porcentaje en el depósito de compuestos fenólicos se presentó en Tepetl y Thomas a 17 °C (Cuadro 3). Los porcentajes más bajos de contenido de fenoles a 28 °C se presentaron en los portainjertos comerciales Duke-7 y Thomas en comparación con el genotipo Tepetl en el que se observó mayor porcentaje de compuestos fenólicos  $p < 0.05$  (Cuadro 3).

### Cuadro 3. Presencia de compuestos fenólicos en células de raíces en genotipos de aguacate muertos, con marchitez y asintomáticos inoculados con *Phytophthora cinnamomi* a dos temperaturas.

Table 3. Presence of phenolic compounds in root cells from avocado dead genotypes with wilting and asymptomatic inoculated with *Phytophthora cinnamomi* at two temperatures.

Genotipos	Contenido de fenoles en raíz (%)					
	Muertos 17 °C	28 °C	Con marchitez		Asintomáticos	
			17 °C	28 °C	17 °C	28 °C
Duke-7	37.44 b*	34.24 c	42.88 b	-‡	-‡	44.4 c
Thomas	62.08 a	59.92 b	51.12 b	58.48 b	41.52 b	89.2 a
Tepetl	70.32 a	73.6 a	67.8 a	56.16 b	71.36 a	57 b
Tepeyanco	†-	†-	†-	83.92 a	71.92 a	34.96 c
Atlixco	†-	†-	†-	47.28 b	18.4 c	58.4 b

\*Valores de medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Duncan 0.05). †-Sin evaluación por ausencia de plantas muertas y con marchitez.

‡Sin evaluación por ausencia de plantas con marchitez y asintomáticas.

### Compuestos fenólicos en plantas con síntomas de marchitez

En la cuantificación del depósito de fenoles en plantas con síntomas de marchitez, Tepetl mostró el porcentaje más alto a 17 °C (67.68%;  $p < 0.05$ ), mientras que el más bajo

histological defense to the severity of infection and survival of the plant against pathogen invasion in dead plants (Del Río *et al.*, 2002). The results obtained in this study show greater accumulation of phenolic compounds in collapsed cells in both temperatures. Phenolic compounds found by Bekker *et al.* (2007) in roots of avocado trees infected with *P. cinnamomi* were the 3, 4-hydroxybenzoic acid and Vanillic acid, compounds that entering in contact with the pathogen serve as physical barriers and confer to the cell wall some resistance to the penetration of *P. cinnamomi*.

In histological sections, another characteristic observed as chemical defense mechanism in dead plants against the infection caused by *P. cinnamomi* was the accumulation of phenolic compounds. The highest percentage in the deposit of phenolic compounds was in Tepetl and Thomas at 17 °C (Table 3). The lowest percentages of phenol content at 28 °C were in commercial rootstocks Thomas and Duke-7 in comparison with Tepetl in which the highest percentage of phenolic compounds  $p < 0.05$  (Table 3) was observed.

### Phenolic compounds in plants with wilt symptoms

In the deposit quantification of phenols in plants with wilt symptoms, Tepetl showed the highest percentage at 17 °C (67.68%;  $p < 0.05$ ), whereas the lowest contents were for Thomas and Duke-7 rootstock (from seed in segregation).

The percentage in phenol content was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in Tepeyanco (83.92%) at 28 °C (Table 3). In Atlixco, Tepetl and Thomas at 28 °C, the content of phenolic compounds was between 47.28 and 58.48% without showing any significant difference with Tepeyanco genotype.

contenido lo tuvieron los portainjertos Thomas y Duke-7 (procedentes de semilla en segregación). El porcentaje en el contenido de fenoles fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en Tepeyanco (83.92%) a 28 °C (Cuadro 3). En las variedades Atlixco, Tepetl y Thomas a 28 °C, el contenido de compuestos fenólicos fue entre 47.28 y 58.48% sin mostrar una diferencia significativa con el genotipo Tepeyanco.

En pruebas *in vitro* se ha probado la presencia de compuestos fenólicos asociada a la resistencia a éste patógeno, y se ha demostrado que la presencia de polifenoles tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del oomiceto (Candela *et al.*, 1995; Fernández y Liddell, 1997; Vidhyasekaran, 2008).

### Compuestos fenólicos en plantas asintomáticas

El mayor contenido de compuestos fenólicos se presentó en los genotipos Tepeyanco y Tepetl a 17 °C y en el portainjerto Thomas a 28 °C. Mientras que, el genotipo Atlixco a 17 °C presentó 18.40% de fenoles en la raíz y Tepeyanco a 28 °C tuvo el porcentaje más bajo de éstos compuestos fenólicos ( $p < 0.05$ , Cuadro 3). Las plantas asintomáticas presentaron resistencia al activar sus mecanismos de defensa química. Los compuestos fenólicos actúan como inhibidores bioquímicos producidos en respuesta al daño ocasionado por *P. cinnamomi*. Estos resultados muestran que la temperatura no es un factor determinante en la presencia de fenoles en la raíz. La resistencia de la planta está relacionada con el depósito de fenoles, ya que la acumulación rápida y temprana de compuestos fenólicos en el sitio de infección es una respuesta de defensa. Esta respuesta de acumulación de fenoles antifúngicos generalmente se producen en mayor cantidad en el momento de la infección (De Ascensao y Dubery, 2003). Estas barreras químicas forman bandas en las células con compuestos fenólicos antifúngicos que refuerzan la pared celular brindándole resistencia (Oullette *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2006). Lo anterior explica por qué las plantas asintomáticas tras la inoculación de *P. cinnamomi*, presentaron resistencia al activar sus mecanismos de defensa química.

### Conclusiones

La cantidad de micelio de *P. cinnamomi* en el xilema de raíces en plantas de aguacate muertas se debió a la susceptibilidad que culmina con la muerte de la planta sin importar la temperatura. Los porcentajes más altos de presencia de micelio en el xilema se observó en el genotipo Tepetl y el portainjerto comercial

*In vitro* tests have been tested for the presence of phenolic compounds associated to the resistance of this pathogen, and has been shown that the presence of polyphenols has the ability to inhibit the growth of oomycete (Candela *et al.*, 1995; Fernández and Liddell, 1997; Vidhyasekaran, 2008).

### Phenolic compounds in asymptomatic plants

The highest content of phenolic compounds was in Tepeyanco and Tepetl genotypes at 17 °C and in Thomas rootstock at 28 °C. While Atlixco at 17 °C showed 18.40% of phenols in root and Tepeyanco at 28 °C had the lowest percentage of these phenolic compounds ( $p < 0.05$ , Table 3). Asymptomatic plants showed resistance when activated the chemical defense mechanisms. Phenolic compounds act as biochemical inhibitors produced in response to damage caused by *P. cinnamomi*. These results show that the temperature is not a crucial factor in the presence of phenols in the root. Plant resistance is related to the deposit of phenols, since the rapid and early accumulation of phenolic compounds in the infection site is a defense response. This response of antifungal phenols accumulation is generally produced in greater quantities at the time of infection (De Ascensao and Dubery, 2003). These chemical barriers form bands in cells with antifungal phenolic compounds that enhance the cell wall providing resistance (Oullette *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2006). This explains why asymptomatic plants after inoculation of *P. cinnamomi*, showed resistance when activated their chemical defense mechanisms.

### Conclusions

The amount of *P. cinnamomi* mycelium in the xylem of roots in avocado dead plants was due to susceptibility culminating in the death of the plant regardless of temperature. The highest percentages of mycelium presence in the xylem was observed in Tepetl genotype and Thomas commercial rootstock when showed wilt symptoms at 17 and 28 °C, indicating that allow the establishment and development of the pathogen within the root. At a histological level, the plants from Atlixco and Tepeyanco selections are resistant by showing wilt symptoms at 28 °C. It was observed that the content of tyloses in these two genotypes was enough to prevent the development of *P. cinnamomi*, in addition to showing higher percentage of asymptomatic plants macroscopically even in presence of mycelium in the xylem.

Thomas cuando presentaron síntomas de marchitez a 17 y 28 °C, lo que indica que permiten el establecimiento y desarrollo del patógeno dentro de la raíz. A nivel histológico, las plantas de las selecciones Tepeyanco y Atlixco de raza Mexicana, son genotipos resistentes por sólo presentar síntomas de marchitez a 28 °C. Se observó, que el contenido de tilosas en estos dos genotipos, fue suficiente para impedir el desarrollo de *P. cinnamomi*, además de que mostraron mayor porcentaje de plantas asintomáticas macroscópicamente aún con presencia de micelio en el xilema.

Los portainjertos Thomas a 17 °C y Duke-7 a 28 °C se consideran tolerantes por mostrar porcentaje similar de tilosas en plantas con síntomas de marchitez. En los genotipos asintomáticos de las selecciones de Tepetl y Tepeyanco tuvieron un aumento porcentual en la presencia de micelio en el xilema a 17 y 28 °C. Estos genotipos son considerados resistentes por estar en contacto íntimo con *P. cinnamomi* a pesar de que no presentaron síntomas macroscópicos. Las selecciones de la raza Mexicana de Tepeyanco, Atlixco y Tepetl mostraron resistencia debido probablemente a que activaron sus mecanismos de defensa histológica estructural y química previo a la infección por *P. cinnamomi*.

## Literatura citada

- Andrade, H. P.; De León, C.; Espíndola, B. M. C.; Alvarado, R.D.; López, J.A. y García, E. R. 2012. Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. usando temperaturas controladas. Spanish J. Rural Development. 4:1-8.
- Agrios, G. N. 2010. Fitopatología. 2ª. ed. Edit. Limusa. D. F., México. 856 p.
- Barrientos, P. A. F. y López, L. L. 2000 Historia y genética del aguacate. In: Téliz, O. D.; González, R. H. y Dromundo, R. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, México. 19-31 pp.
- Bekker, T.; Aveling, T.; Kaiser, C.; Labuschagne, N. and Regnier, T. 2007. Accumulation of total phenolics due to silicon application in roots of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi*. Sixth World Avocado Cong. Villa del Mar, Chile. 1-11 pp.
- Bellon, M. R.; Barrientos, P. A. F.; Colunga, G. M. P.; Perales, H.; Reyes, A. J. A.; Rosales, S. R. y Zizumbo, V. D. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en capital natural de México. Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México. 2:365-368.
- Candela, M. E.; Alcazar, M. D.; Espín, A.; Egea, C. and Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *capsicum annum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathol. 44:116-123.
- Cruz, B. M.; Hernández, F. y Rivas, F. E. 2006. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. La Habana, Cuba. Temas de Ciencia y Tecnología. 29:45-54.

Thomas rootstocks at 17 °C and Duke-7 at 28 °C are considered tolerant for showing similar percentages of tyloses in plants with wilt symptoms. In asymptomatic genotypes from Tepeyanco and Tepetl selections had a percentage increase in the presence of mycelium in xylem at 17 and 28 °C. These genotypes are considered resistant for being in intimate contact with *P. cinnamomi* despite not showing macroscopic symptoms. The selections of the Mexican race Tepeyanco, Atlixco and Tepetl showed resistance probably because activated their histological structure and chemical defense mechanisms prior to infection by *P. cinnamomi*.

End of the English version



- De Ascensao, A. R. and Dubery, I. A. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Phytochemistry. 63:679-686.
- Del Río, J. A.; González, A.; Fuster, M. D.; Botía, J. M.; Gómez, P.; Frías, V. and Ortuño, A. 2002. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoaniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. Phytopathology Mediterranean. 40:S394-S399.
- Dimond, A. E. 1955. Pathogenesis in the wilt diseases. Ann. Rev. Plant Physiol. 6:329-350.
- Fernández, P. S. and Liddell, C. M. 1997. Resistance of *capsicum annum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. Phytopathology. 87:529.
- Gallo, L. L. 1992. Update of Canary Island research on West Indian avocado rootstocks tolerant/resistance to *Phytophthora* root rot. Proc. of second world avocado Cong. 105-110 pp.
- Gallo, L. L.; Pérez, Z. S. y Siverio, D. R. F. 1999. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en patrones de aguacate de raza antillana. Rev. Chapingo, Serie Hortic. 5:275-277.
- García, A. F. y Fraile, A. 1996. Patología vegetal. Edit. Phytoma. Sociedad Española de Fitopatología. 25 p.
- Grant, B. R. and Byrt, P. N. 1984. Root temperature effects on the growth of *Phytophthora cinnamomi* in the roots of *eucalyptus marginata* y *E. calophylla*. Phytopathology. 74:179-184.
- Hobbess, M. 2004. Induced resistance for the control of Dutch elm disease. Formerly Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales. 13:185-196.
- Kremer, K. S. and Kohne, J. S. 2007. 25 years of avocado rootstock development in South Africa. In: Preceedings VI World Avocado Congress 2007. Viña del Mar, Chile. P 1-7.
- López, C. M. L.; Márquez, G. J. y Murguía, S.G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. 2ª. (Ed.). Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de México (UNAM). México, D. F. 178 p.
- Misaghi, I. J.; Devay, J. E. and Duniway, J. M. 1978. Relationship between occlusions of xylem elements and disease symptoms in leaves of cotton plants infected with *Verticillium dahliae*. Can. J. Bot. 56:339-342.

- Newett, S. D. E.; Crandy, J. H. and Balerdi, C. F. 2002. Cultivars and rootstocks. *In*: Whiley, A.; Schaffer, W. and Wolstenholme, B. *Avocado: botany, production and uses*. B. N. Eds. CABI Publ. 161-187 pp.
- Niks, R. E. y Lindhout, W. H. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Dept. Plant Breeding. Wageningen University. 216 p.
- Ouellette, G. B. and Rioux, D. 1992. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch Elm Disease. *In*: Blanchette, A. and Biggs, R. *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. Edits. Springer-Verlag, Berlin. 257-310 pp.
- Salazar, G. S.; Velasco, C. J. J.; Medina, T. R. y Gómez, A. J. R. 2004. Selecciones de aguacate con potencial de uso como portainjertos. I. Prendimiento y crecimiento de injerto. *Rev. Fitotec. Mex.* 27:23-30.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2001. SAS/STAT User guide. Release 9.0. Ed. North Carolina, USA. 1289 p.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30:3875-3883.
- Schlosser, E. 1994. Preformed phenols as resistance factors. *Acta Horticulturae*. 381:615-630.
- Sepúlveda, R. P.; Álvarez, A. M.; Botti, G. C.; Valenzuela, B. J. y Sepúlveda, R. G. 1979. Estudio morfoanatómico del amarillamiento de la vid (*Vitis vinifera* L.). *Agric. Téc.* 39:95-102.
- Téliz, O. D. y Mora, A. J. A. 2007. El manejo integral parcial del aguacate. *In* Téliz, O. D.; Mora, A. *El aguacate y su manejo integral*. 2ª. (Eds.). Editorial Mundi- Prensa, México. D. F., 287-306 pp.
- Vidales, F. J. A. y Alcántar, R. J. J. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands) del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Rev. Chapingo, Serie Hortic.* 5:255-259.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plant and crops. *Molecular biology and host defense mechanisms*. 2nd. ed. CRC Press. Florida, USA. 509 p.
- Vleeshouwers, V.; van Dooijeweert, W. V.; Govers, F.; Kamoun, S. and Colon, L. T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*. 210:853-864.
- Walker, J. C. H. 1957. *Plant pathology*. 2<sup>nd</sup> (Ed.). McGraw-Hill Book Co., Inc. USA. 707 p.
- Zentmyer, G. A. and Schieber, E. 1987. The search for resistance to *Phytophthora* root rot in Latin America. *South African Avocado Growers Assoc. Yearbook* 10:109-110.