

# ANATOMÍA DEL DAÑO POR ROZAMIENTO Y POR *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. EN FRUTO DE AGUACATE 'HASS'

## ANATOMY OF DAMAGE BY FRICTION AND BY *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. IN AVOCADO FRUIT 'HASS'

Trinidad Zamora-Magdaleno<sup>1</sup>, Elizabeth Cárdenas-Soriano<sup>2</sup>, Jacques F. Cajuste-Bontemps<sup>3</sup> y Ma. Teresa Colinas-León<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Calle Cedro Núm. 203. Colonia INFONAVIT Aguacates. Uruapan, Michoacán. <sup>2</sup>Especialidad de Postgrado en Fitopatología. IFIT. (esoriano@colpos.colpos.mx) y <sup>3</sup>en Fruticultura. IREGEP. (ferrebo@colpos.colpos.mx). Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México. <sup>4</sup>Departamento de Fitotecnia. UACH. 56230, Chapingo, Estado de México. (mtcolina@taurus1.chapingo.mx)

### RESUMEN

Las exportaciones mexicanas de aguacate 'Hass' (*Persea americana* Mill) a los mercados de Europa y Japón son afectadas por la presencia de manchas oscuras en el fruto ocasionadas por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y por efecto de rozamiento durante la cosecha y postcosecha. Con el propósito de caracterizar anatómicamente el daño interno por rozamiento y por antracnosis, se aplicó la técnica de inclusión en parafina a tejidos sanos y a otros con síntomas externos de ambas lesiones. Los tejidos correspondieron a secciones de exocarpio y mesocarpio, los cuales se cortaron a 10  $\mu$  m de grosor y se tiñeron con safranina-verde rápido. Además se efectuó la prueba histoquímica de la reacción nitrosa para determinar polifenoles totales y se evaluó la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) mediante la reacción de catecol. En el daño ocasionado por *C. gloeosporioides* Penz. se observó: a) hiperplasia en el estrato de células más interno del exocarpio y mesocarpio, b) depósitos de fenoles en los estratos de células dañadas, y c) desorganización y colapso celular en estados avanzados de la infección. La lesión quedó limitada por una "zona de abscisión". En la lesión por rozamiento, las células del exocarpio se necrosan, y no se observó un estrato de células muertas colapsadas que evite el avance de la misma. Las manchas oscuras, consecuencia del rozamiento y antracnosis en el fruto se deben a la oxidación de polifenoles depositados en las paredes celulares de las células muertas y espacios intercelulares.

**Palabras clave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Persea americana*, daño mecánico, postcosecha, polifenoles.

### INTRODUCCIÓN

En el fruto del aguacate (*Persea americana* Mill.) la enfermedad de mayor importancia económica, por las pérdidas que ocasiona, es la inducida por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. En el campo los frutos presentan síntomas denominados "viruela", "clavo" y más frecuentemente antracnosis.

### ABSTRACT

Mexican exports of "Hass" avocado fruit to European and Japanese markets are affected by the presence of dark spots on the fruit caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, and also as a consequence of bruising during harvest and postharvest. In order to characterize internal injuries from bruising and antracnose anatomically, the technique of inclusion in paraffin was applied to healthy tissues and to tissues with external symptoms of both kinds of injury. The tissues were sections of exocarp and mesocarp, 10 mm thick and dyed with fast green-safranin. Also, a histochemical nitrous reaction test was conducted to determine total polyphenols, and the activity of the polyphenoloxidase (PPO) enzyme was evaluated through catechol reaction. In injuries caused by *C. gloeosporioides* Penz, the following indicators were observed: a) hyperplasia in the innermost cell layers of the exocarp and mesocarp, b) deposits of phenol in the layers of damaged cells, and c) cell disorganization and collapse in advanced stages of infection. Lesions were limited by an "abscission zone." In injuries from bruising, the cells of the exocarp become necrotic and there was no layer of dead collapsed cells to prevent the progress of the process. The dark spots, consequence of bruising and antracnose in the fruit, were associated with oxidation of polyphenols deposited in the cell walls of the dead cells and in intercellular spaces.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Persea americana*, mechanical injury, postharvest, polyphenol.

### INTRODUCTION

In avocado fruit (*Persea americana* Mill.), the most economically important disease, because of the losses it causes, is that induced by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In the field, the fruits show symptoms called "pox," "pock" or, most frequently, antracnose.

Another problem that can reduce the commercial value of the fruit is bruising on the exocarp caused by friction between fruits or with branches during their growth on the tree and later during harvest, packing, storage and transport.

Recibido: Sin información. Aprobado: Agosto, 2000.  
Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 35: 237-244. 2001.

Otro problema que puede disminuir el valor comercial del fruto es el rozamiento del exocarpo originado por la fricción entre frutos o con ramas durante su desarrollo en el árbol y posteriormente en la cosecha, empaclado, almacenamiento y transporte.

En Uruapan, Michoacán, el daño por rozamiento es frecuente; sin embargo, durante las operaciones de empaque no es fácil detectarlo, lo que conduce a rechazos por parte de mercados distantes, al manifestarse a su arribo. Zamora *et al.*<sup>5</sup> estimaron que 78% de los frutos presenta este problema, observándolo tanto en el campo durante el corte, como en el empaque al clasificarlo y seleccionarlo. El rozamiento se manifiesta en el exocarpo de los frutos inmaduros como una mancha de color café que se torna negra y que posteriormente va profundizándose hasta quedar hundida. Las lesiones por rozamiento pueden ser puerta de entrada de microorganismos en postcosecha, volviendo al fruto más sensible al frío y reduciendo su vida de anaquel.

Antes de que el síntoma típico de viruela por *C. gloeosporioides* se manifieste en los frutos en desarrollo, se observan manchas translúcidas redondas de 0.5 a 1.0 mm; después se forma una elevación de color naranja que posteriormente cambia a café oscuro. Estas lesiones no llegan a coalescer, pero pueden ser numerosas. Durante las fases de cosecha y empaclado, la manipulación del fruto incrementa las lesiones, las que presentan un aspecto similar al observado en el rozamiento.

El síntoma de viruela se inicia con manchas pequeñas, de color café claro y después café oscuro, hundidas; el tejido dañado es translúcido y se produce una elevación de color verde brillante con secreción de color morado, que al secarse se torna de color blanco y de aspecto polvoriento. Con el tiempo la lesión toma un aspecto seco y quebradizo, en forma de cráter, llegando a desprenderse (Campos, 1987).

El síntoma de antracnosis en el campo se manifiesta por manchas redondas o irregulares de color café oscuro y hundidas, que en condiciones de alta humedad relativa pueden coalescer. En postcosecha este síntoma adquiere importancia si un fruto con una lesión pequeña no es eliminado durante la selección en empaque (Campos, 1987). Aunque en el campo los productores reconocen diversos síntomas inducidos por *C. gloeosporioides*, en postcosecha éstos se identifican como antracnosis.

El propósito de este estudio fue caracterizar anatómica e histoquímicamente las lesiones originadas por viruela (en dos estados de desarrollo), antracnosis y rozamiento, así como determinar si la coloración café que se observa en cada una de ellas es consecuencia de una necrosis celular, de la presencia de polifenoles, o de ambas.

In Uruapan, Michoacán, injury from bruising is frequent; however, during packing operations, it is not easy to detect it, leading to rejection in far off markets when the damage becomes evident. Zamora *et al.*<sup>5</sup> estimated that 78% of the fruits present this problem, observing damage caused in the field at harvest, as well as during packing while they are classified and selected. Bruising appears in the exocarpe of immature fruits as a brown spot that turns black and later deepens until it becomes a depression. Injuries from bruising can be the entry way for microorganisms during postharvest, making the fruit more sensitive to chilling and shortening its shelf life.

Before the typical pox symptom of *C. gloeosporioides* becomes apparent in growing fruits, round, translucent spots from, 0.5 to 1.0 mm, can be observed. Later, an orange-colored bump appears which afterwards changes to dark brown. These lesions do not coalesce, but can be numerous. During the harvest and packing phases, handling increases the lesions and they present a similar aspect to those resulting from bruising.

The pox symptom begins with small, light brown spots which later become dark brown and sunken. The damaged tissue is translucent and produces a bright green bump with a reddish-purple secretion, which turns powdery white when it dries. Over time, the lesion becomes dry, fragile and crater-shaped, and may come off (Campos, 1987).

The anthracnose symptom in the field is manifested by round or uneven dark brown, sunken spots, which can coalesce in high relative humidity. During postharvest, this symptom acquires importance if a fruit with a small lesion is not eliminated during selection and packing (Campos, 1987). Although in the field growers recognize several symptoms induced by *C. gloeosporioides*, in postharvest only the name anthracnose is used.

The purpose of this study was to characterize anatomically and histochemically the injuries caused by pox (in two stages of development), anthracnose and bruising, and to determine whether the brown coloring observed in either is a consequence of cellular necrosis, of the presence of polyphenols, or of both.

## MATERIALS AND METHODS

Healthy fruits and fruits injured by bruising, pox and anthracnose were collected in a commercial orchard of the producer region of Uruapan, Michoacán. The fruits were cut into 0.5 cm portions that included damaged tissue. These were fixed in Craf III and washed under running water for 15 minutes. They were then dehydrated in an ascending series of ethyl alcohol (50, 70, 96, and 100%). Once

<sup>5</sup> Zamora M., M. T., M. E. Equihua A. y M. A. Guijosa S. 1991. Aspectos de postcosecha en aguacate (*Persea americana* Mill) var. Hass de tres regiones de Michoacán. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán, 334 p.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron frutos sanos y con lesiones de rozamiento, viruela y antracnosis en un huerto comercial de la región productora de Uruapan, Michoacán. Los frutos se seccionaron en porciones de 0.5 cm, que abarcaban el daño. Se fijaron en Craff III, se lavaron en agua corriente durante 15 minutos y se deshidrataron con una serie ascendente de alcohol etílico, (50, 70, 96 y 100%). Una vez deshidratados y clarificados con xileno, los tejidos se pasaron por tres cambios de Paraplast, para finalmente incluirlos en el último cambio.

Para hacer los cortes se utilizó un micrótopo rotatorio. Los cortes fueron transversales, de 10  $\mu\text{m}$  de grosor, y se montaron en portaobjetos con adhesivo de Haupt. La tinción de los cortes se efectuó con safranina-verde rápido (Johansen, 1940).

Para la prueba de polifenoles totales se tomaron trozos del exocarpio con mesocarpio y se hicieron cortes de 25  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótopo de congelación. Se aplicó la prueba de reacción nitrosa y se determinó la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) mediante la reacción de catecol, propuesta por Kader y Chordas (1984).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Anatomía del exocarpio y mesocarpio sanos

El exocarpio está limitado por una cutícula gruesa con proyecciones entre las paredes anticlinales de las células epidérmicas. Ceras epicuticulares cubren la superficie del fruto. La epidermis es uni-stratificada y en su interior contiene polifenoles, que con la tinción de safranina-verde rápido se observan como cuerpos densos de color rojizo. Debajo de la epidermis se encuentran varias capas de células parenquimatosas, conteniendo en su interior polifenoles de color castaño (Figura 1A). Grupos de células esclerenquimatosas se presentan en el límite entre el exo y mesocarpio.

El mesocarpio está constituido por células parenquimatosas sin polifenoles, y entre ellas se encuentran los haces vasculares e idioblastos, donde se depositan los lípidos.

### Anatomía del rozamiento

En daños por rozamiento, inicialmente sólo la primera capa de células parenquimatosas debajo de la epidermis se colapsa y necrosa. Después, conforme se desarrolla la lesión, el colapso y la necrosis de las células avanza internamente y hacia los lados y las células de la epidermis se mantienen sin daño (Figura 1B). En estas circunstancias el grosor de la cutícula podría jugar un papel decisivo al evitar o retardar la muerte de las células epidérmicas, como lo menciona Agrios (1985). Se indujo poca hiperplasia en células de parénquima cercanas a las ya necrosadas. Los depósitos de polifenoles, que con la tinción de safranina-verde rápido dieron una coloración

dehidratada y clarificada con xileno, los tejidos underwent three changes of Paraplast, to finally include them in the last change.

Sections were cut with a rotary microtome. The cross sections were 10 mm thick and were mounted on a slide with Haupt's adhesive. The sections were dyed with fast green-safranin (Johansen, 1940).

The nitrous reaction test was used for total polyphenol, using pieces of exocarpio with adhered mesocarpio which were cut in 25 mm-thick sections with a freezer microtome. The activity of the enzyme polyphenoloxidase (PPO) was determined with the catechol reaction, as proposed by Kader and Chordas (1984).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Anatomy of healthy exocarpio and mesocarpio

The exocarpio is limited by a thick cuticle with projections between the anticlinal walls of the epidermis cells. Epicuticular wax covers the fruit surface. The epidermis is uni-stratified and in the inner part contains polyphenols, which can be seen with fast green-safranin dye as dense, reddish bodies. Below the epidermis are found several layers of parenchyma cells containing chestnut-brown polyphenols (Figure 1A). Groups of sclerenchyma cells are present in the borderline between the exocarpio and the mesocarpio.

The mesocarpio is constituted of parenchyma cells without polyphenols, and around these cells vascular bundles and idioblasts are found, where lipids are deposited.

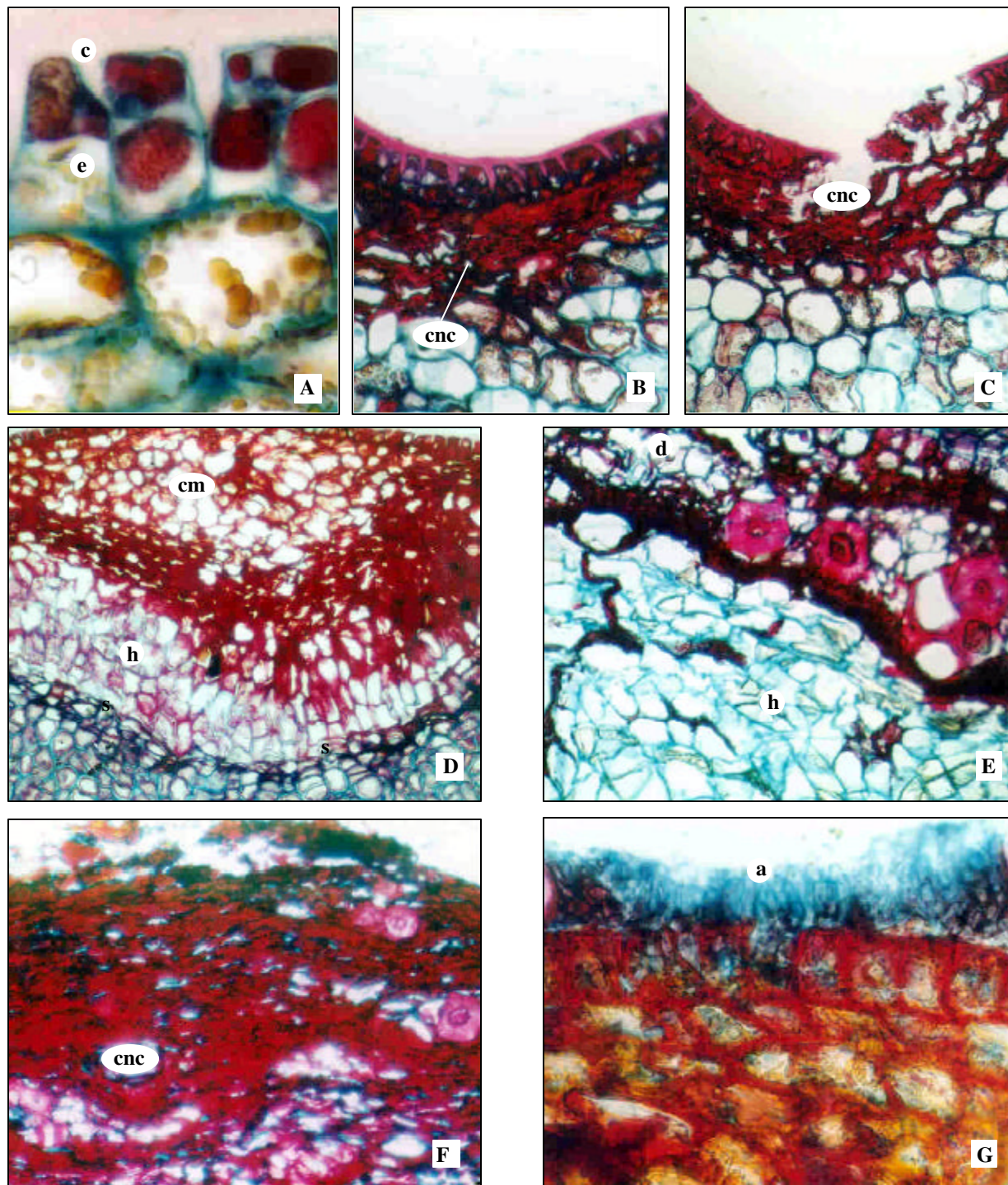
### Anatomy of bruising

In bruised tissues, initially only the first layer of parenchyma cells below the epidermis are collapsed and become necrotic. Later, as the lesion develop, collapse and necrosis of the cells progresses inward and toward the sides, while the cells of the epidermis remain undamaged (Figure 1B). In these circumstances, the thickness of the cuticle could play a decisive role in preventing or delaying the death of the epidermal cells, as mentioned by Agrios (1985). Little hyperplasia was induced in parenchyma cells near the already necrosed cells. The deposits of polyphenols, which with the fast green-safranin dye gave to the cell walls and cell interiors a reddish color (Figure 2B), could prevent the early entry of microorganisms.

In old injuries, when they are sunken, the epidermis is necrotic and, because the tissues are dead, the lesions came off easily, as seen in Figure 1C.

### Anatomy of pox

In the initial state of pox, necrotic parenchyma cells of the exocarpio were observed. As the infection progresses



**Figura 1.** Cortes histológicos transversales de fruto de aguacate 'Hass'. A) Corte de tejido sano de exocarpio, cutícula (c) con proyecciones en las paredes anticlinales de las células epidérmicas (e), polifenoles rojizos en la epidermis y castaños en las células de parénquima. B) Lesión de rozamiento, células necrosadas y colapsadas (cnc), con depósitos de polifenoles. C) Rompimiento de las células necrosadas. D) Lesión temprana de viruela, células muertas con polifenoles intercelulares (cm), hiperplasia (h) y estrato (h) de células muertas limitando la lesión. E) Viruela típica, hiperplasia en el mesocarpio (h) y desorganización celular (d) en el exocarpio. F) Estado final de la lesión de antracnosis; la mayoría de las células del exocarpio se encuentran necrosadas y colapsadas. G) Acérvulos (a) del hongo sobre la lesión.

**Figure 1.** Histological cross sections of avocado 'Hass' fruits. A) Section of healthy exocarp tissue, cuticle (c) with projections in the anticlinal walls of the epidermis cells (e), reddish polyphenols in the epidermis and chestnut brown in the parenchyma cells. B) Bruising, necrotic and collapsed cells (cnc), with polyphenol deposits. C) Rupture of necrotic cells. D) Early lesion of pox, dead cells with intercellular polyphenols (cm), hyperplasia (h) and layer (h) of dead cells enclosing the lesion. E) Typical pox, hyperplasia in the mesocarp (h) and cellular disorganization (d) in the exocarp. F) Final state of the anthracnose lesion, most of the exocarp cells are necrotic and collapsed. G) Acervuli (a) of the fungus on the lesion.

rojiza en las paredes celulares y en el interior de las células (Figura 2B), podrían evitar la entrada temprana de microorganismos.

En lesiones viejas, cuando ya están hundidas, la epidermis se observa necrosada y, debido a que los tejidos están muertos, se desprenden fácilmente, como se observa en la Figura 1C.

### **Anatomía de la viruela**

En un estado inicial de la viruela se observaron células de parénquima del exocarpo necrosadas; a medida que la infección avanzó internamente, más células murieron, su contenido citoplasmático disminuyó y sus paredes se tornaron amarillas como si los polifenoles ahora se depositaran en ellas. Esta coloración también se observó en los espacios intercelulares. La lesión quedó localizada por células muertas. La elevación que se observa externamente en la lesión es consecuencia de la hiperplasia que sufren las células más internas del exocarpo. El estrato de células nuevas originadas por la hiperplasia y las células muertas colapsadas dan la apariencia de una “zona de abscisión” y quizás actúe como tal, ya que la lesión se puede desprender del resto del fruto (Figura 1D).

En la etapa más avanzada de viruela la epidermis se observó necrosada, y el área de células parenquimatosas muertas fue mayor. En este caso, la hiperplasia la presentan células del mesocarpo. La hiperplasia, junto con la necrosis, producen una desorganización celular en el exocarpo (Figura 1E).

### **Anatomía de la antracnosis**

Cuando la lesión se inicia, el daño se presenta en una pequeña área de células de parénquima del exocarpo, asimismo se aprecia el depósito de polifenoles en las paredes celulares de células muertas y en espacios intercelulares. Conforme la lesión se desarrolla, la proporción de células muertas es mayor y muchas de estas células se colapsan (Figura 1F). Esta muerte y colapso celular abundante dan el síntoma externo típico de la lesión por antracnosis; además, por supuesto, de la presencia de las estructuras reproductoras del hongo (Figura 1G).

Tanto en las lesiones por antracnosis como por viruela, en un estado temprano de su desarrollo no se encontró micelio del hongo en el interior de las células de la epidermis y parénquima del exocarpo y mesocarpo. Posteriormente se observaron los acérvulos del hongo. En aguacate se han caracterizado las lesiones por *C. gloeosporioides* como infecciones latentes o quiescentes, debido a que en frutos inmaduros el hongo permanece en latencia en estado de apresorio. Más tarde se encontró que el apresorio emite su punta infectiva que permanece

inwardly, more cells died, their cytoplasmic content diminished, and their walls became yellow as if polyphenols were deposited. This color was also observed in intercellular spaces. The lesion was isolated by dead cells. The bump that is observed externally in the lesion is a consequence of the hyperplasia that the innermost cells of the exocarpo suffer. The layer of new cells produced by hyperplasia and the collapsed dead cells give the appearance of an “abscission zone,” and may act as one, since the lesion can be separated from the rest of the fruit (Figure 1D).

In the most advanced stage of pox lesion the epidermis was necrotic, and the area of dead parenchyma cells was larger. In this case, the hyperplasia is present in mesocarpo cells. Hyperplasia, together with necrosis, produces a cellular disorganization in the exocarpo (Figure 1E).

### **Anatomy of anthracnose**

When the lesion begins, damage is present in a small area of parenchyma cells of the exocarpo. Also, a deposit of polyphenols in the cell walls and intercellular spaces of the dead cells can be observed. As the lesion progresses, the proportion of dead cells is larger, and many of these cells collapse (Figure 1F). This abundant death and collapse of cells results in the external symptom typical of anthracnose lesions and; besides, of course, of the presence of reproductive structures of the fungus (Figure 1G).

In lesions caused by both anthracnose and pox, in the early stages of development, no mycelia of the fungus was found in the inner part of the epidermis and parenchyma cells of the exocarpo and mesocarpo. Later on, acervuli of the fungus were observed. In avocado, lesions caused by *C. gloeosporioides* have been characterized as latent or quiescent infections because in immature fruits the fungus remains in a latent appressorium state. It was later found that the appressorium emits an infective tip which remains below the cuticle until the fruit begins to mature, or before softening, when it colonizes the exocarpo and mesocarpo (Binyamini and Schiffmann-Nadel, 1972). The latent state of the infection is due to the presence of preformed anti-fungal compounds that inhibit the fungus early colonization in the fruit. These anti-fungal compounds are 1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxoheneicos-12, 15 dieno and 1-acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-eno. In maturing fruits, the concentration of these two compounds diminishes because of the increased activity of the enzyme lipoxygenase, whose activity is regulated by the presence of flavan-3-ol, epicatequin (a phenol compound). In this way infection progresses in the fruit (Prusky *et al.*, 1982, 1985, 1988, 1992).

The phenolic nature of the deposits in the cell walls and in the intercellular spaces dyed with reddish safranin

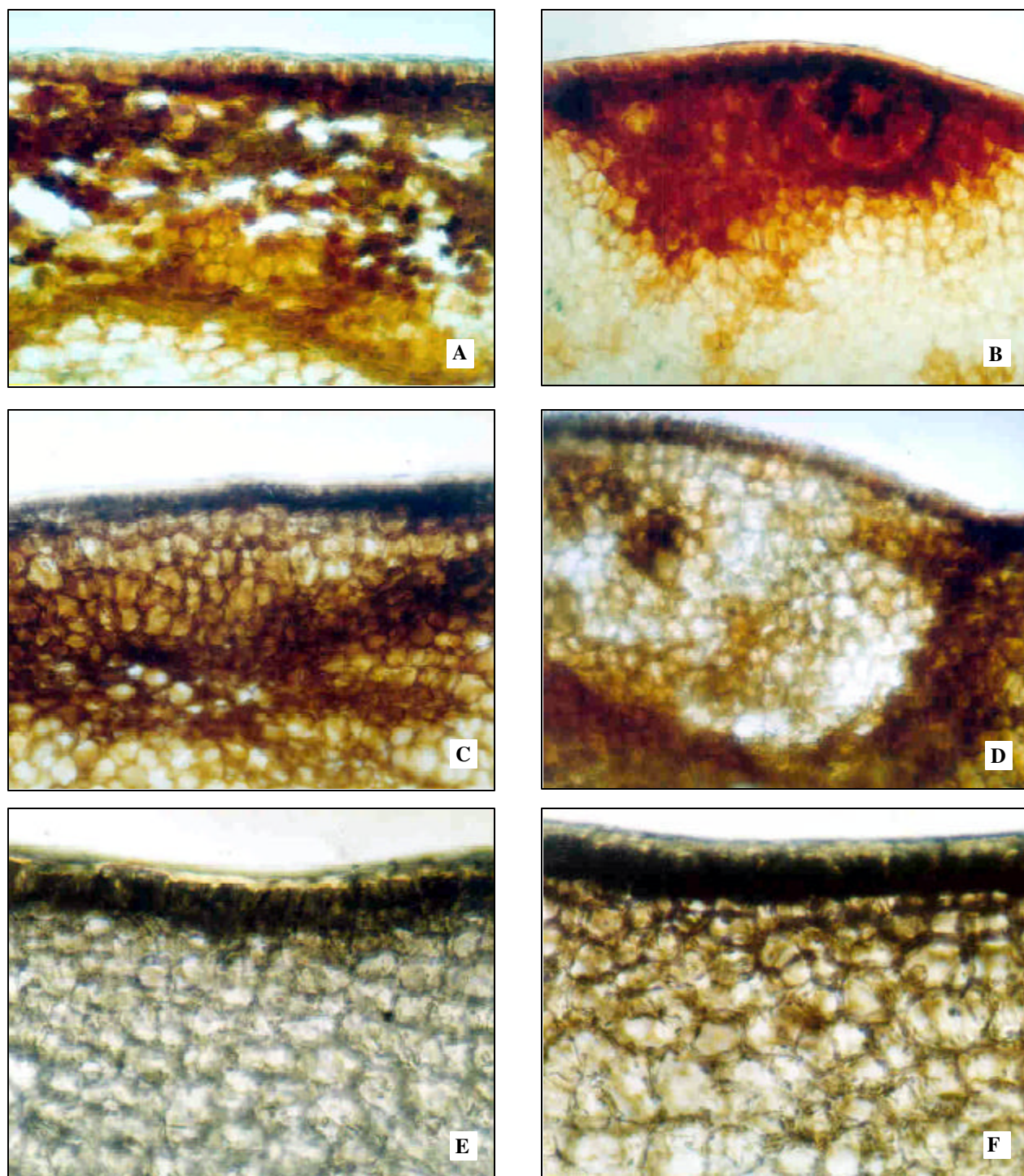


Figura 2. Pruebas histoquímicas en cortes transversales de frutos de aguacate 'Hass'. A-B) Reacción nitrosa A) Lesión de rozamiento, coloración obtenida con la reacción, sólo en las áreas dañadas. B) Lesión por *C. gloeosporioides*. C-D) Reacción con catecol. C) Lesión por rozamiento en el exocarpio del fruto. D) Reacción en la lesión de antracnosis. E-F) Cortes de frutos sanos. E) Con la prueba nitrosa para polifenoles totales y D) con la reacción de catecol para determinar la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO).

Figure 2. Histochemical tests in the cross sections of avocado 'Hass' fruits. A-B) Nitrous reaction A) bruising, coloring obtained with the reaction only in damaged areas. B) Lesion caused by *C. gloeosporioides*. C-D) Cathecol reaction. C) Bruise in the exocarp of the fruit. D) Reaction in the anthracnose lesion. E-F) Sections of healthy fruit. E) With the nitrous test for total polyphenols and D) With the catechol reaction to determine the activity of the polyphenoloxidase enzyme (PPO).

subcuticularmente hasta que el fruto empieza a madurar, o antes del ablandamiento, que es cuando coloniza el exocarpo y mesocarpo (Binyamini y Schiffmann-Nadel, 1972). El estado latente de la infección se debe a la presencia de compuestos antifúngicos preformados que inhiben la colonización temprana del fruto por el hongo. Estos compuestos antifúngicos son: el 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,15 dieno y el 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-eno. En frutas en maduración, la concentración de estos dos compuestos disminuye por un aumento de la actividad de la enzima lipoxigenasa, cuya actividad es regulada por la presencia de flavan-3-ol, epicatequina (un compuesto fenólico), progresando así la infección en el fruto (Prusky *et al.*, 1982, 1985, 1988, 1992).

La naturaleza fenólica de los depósitos en las paredes celulares y en los espacios intercelulares teñidos por la safranina de color rojizo, se confirmó con la reacción nitrosa para polifenoles totales. La prueba fue positiva únicamente en las zonas afectadas (Figuras 2A,B). La reacción con catecol puso de manifiesto la actividad de la PPO también sólo en los sitios dañados (Figuras 2C,D). En los materiales sanos no se presentó la coloración rojiza que indicara la presencia de polifenoles y aunque con la prueba de catecol si hubo reacción, ésta fue menos evidente que cuando existe daño (Figuras 2E,F). Bower y Cutting (1988) reportan que existen por lo menos dos formas de la enzima PPO responsables del oscurecimiento en aguacate: una se encuentra en forma ligada o latente en la membrana interna del tilacoide en los cloroplastos; la otra se presenta en estado libre o activa, lo que le permite reaccionar inmediatamente con el sustrato en presencia de oxígeno. En el caso del síntoma por rozamiento, al producirse daño en los tejidos, con la consecuente pérdida de la compartimentalización, se pondrían en contacto la enzima y el sustrato y de ahí el oscurecimiento; lo mismo ocurriría en el síntoma de viruela y en el de antracnosis.

En las lesiones, inmediatamente después que se da el estímulo, ya sea por la fricción o por el arribo y la germinación del patógeno, al parecer se produce un desencadenamiento de reacciones químicas cuyos productos ocasionan la muerte celular y la oxidación de los polifenoles normalmente presentes en el exocarpo del aguacate. Esta suposición del cambio en la naturaleza química de los polifenoles preformados se deriva de que no tuvieron reacción positiva a la prueba nitrosa y de catecol.

## CONCLUSIONES

Existen diferencias entre las lesiones; la lesión por rozamiento es hundida debido a la muerte de células del parénquima del exocarpo y no se presenta un estrato de

was confirmed with the nitrous reaction for total polyphenols. The test was positive only in the affected zones (Figures 2A,B). The catechol reaction also gave evidence of PPO activity only in the damaged sites (Figures 2C,D) In the healthy materials the reddish color, which indicates the presence of polyphenols, did not appear, and even though with the catechol test there was a reaction, it was less evident than when there was damage (Figures 2E,F). Bower and Cutting (1988) report that there are at least two forms of the PPO enzyme that are responsible for darkening in avocado. One is found in a linked or latent state in the internal membrane of the chloroplast thylakoid; the other is in a free or active state which allows it to react immediately with the substrate in presence of oxygen. In the case of bruising symptoms, when tissues are damaged with the consequent loss of compartmentalization, the enzyme and substrate come into contact and the tissue darkens. The same would occur in the pox or anthracnose symptoms.

In lesions, immediately after the stimulus is produced, either by bruising or by the arrival and germination of the pathogen, chemical reactions are apparently unleashed and their products cause cells death and oxidation of the polyphenols normally present in the avocado exocarpo. The assumption of a change in the chemical nature of the preformed polyphenols derives from the fact that they did not react positively to the nitrous and catechol tests.

## CONCLUSIONS

There are differences among the lesions. Lesions from bruising are sunken because of parenchyma cells' death of the exocarpo and there is no layer of dead cells that limit them. In pox, there is less death and collapse of cells than in the lesions caused by anthracnose. In both cases damage is enclosed by a cell layer similar to the abscission zone in leaves, formed by new cells originating from hiperplasia of the cells of the exocarpo in pox, and from mesocarpo in anthracnose. The bump that appears in the lesions is due to hiperplasia and its detachment from the fruit by the "abscission zone." External contact of the fungus and mechanical damage from bruising produce a chain of chemical reactions which are responsible of cell death and oxidation of polyphenols. Darkening of bruised tissue as well as of the lesions caused by the fungus are due to deposits of oxidized polyphenols in the cell walls and intercellular spaces of dead cells.

—End of the English version—



células muertas que la limite; en la viruela la muerte celular y el colapso de estas células es menor que en la

lesión por antracnosis. En ambos casos, el daño queda limitado por un estrato que se asemeja al de la zona de abscisión en hojas, formado por células nuevas originadas por hiperplasia de células del exocarpio en la viruela y del mesocarpio en la antracnosis. La elevación manifiesta en las lesiones se debe a la hiperplasia y su desprendimiento del fruto por la "zona de abscisión". El contacto externo del hongo y el daño mecánico por rozamiento inducen el desencadenamiento de reacciones químicas; cuyos productos son los que ocasionan la muerte celular y la oxidación de los polifenoles. La coloración del tejido en el daño por rozamiento, así como la que presentan las lesiones por el hongo, se originan por depósitos de polifenoles oxidados en las paredes celulares y los espacios intercelulares de células muertas.

### LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 1985. Fitopatología. Ed. Limusa, México. 756 p.
- Binyamini, N., and M. Schiffmann-Nadel. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 62: 592-594.
- Bower, J. P., and J. G. Cutting. 1988. Avocado fruit development and ripening physiology. *Hort. Rev.* 10: 229-271.
- Campos A., J. 1987. Viruela o clavo del aguacatero *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: Memoria Primer Curso Fitosanitario y de Nutrición en Aguacate. Uruapan, Mich., México. pp: 141-148.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc. N. Y. 523 p.
- Kader, A. A. and A. Chordas. 1984. Evaluating the browning potential of peaches. *Calif. Agric.* 38: 14-15.
- Prusky, D., N. T. Kenn, J. J. Sims, and S. Midland. 1982. Possible involvement of an antifungal compound in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. *Phytopathology* 72: 1578-1582.
- Prusky, D., I. Kobilier, B. Jacoby, J. J. Sims, and S. L. Midland. 1985. Inhibitors of avocado lipoxygenase: their possible relationship with the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 269-279.
- Prusky, D., I. Kobilier, and B. Jacoby. 1988. Involvement of epicatechin in cultivar susceptibility of avocado fruit to *Colletotrichum gloeosporioides* after harvest. *Phytopathology* 123: 140-146.
- Prusky, D., I. Kobilier, N. T. Keen, and J. J. Sims. 1992. Regulation of natural resistance of avocado fruit for the control of postharvest disease. *Proc. Second World Avocado Congress*. California, USA. pp: 479-484.