ACUMULACIÓN DE FENÓLICOS TOTALES ATRIBUIBLE A LA APLICACIÓN DE SILICIO EN RAÍCES DE ÁRBOLES DE AGUACATE INFECTADOS CON Phytophthora cinnamomi

T. Bekker¹, T. Aveling², C. Kaiser¹, N. Labuschagne² y T. Regnier²

1 Departamento de la Producción de Plant y la Ciencia de Tierra, 2 Departamento de Microbiología y Patología de Plant, la Universidad de Pretoria, 0002, Sudáfrica. Email: tbekker@tuks.co.za.

La acumulación de fenoles y polímeros fenólicos en *Persea americana* Mill. detectados en raíces expuestas al patógeno *Phytophthora cinnamomi* (Pc), y tratadas con silicato de potasio fueron investigados durante un ensayo de campo. Los datos informados demuestran que la aplicación de silicato de potasio en árboles de aguacate infectados con Pc aumentó el contenido fenólico total del tejido radical. Los ensayos consistieron en tres aplicaciones (Six3) durante marzo de 2005 y enero de 2006. Después de elicitar información, se encontró que metabolitos fenólicos conjugados y no conjugados fueron inducidos. Significativamente las concentraciones fenólicas crudas más altas son informadas en aplicaciones de Si x 3 durante marzo y mayo 2006 en comparación con fosfonato de potasio (Avoguard ®) y tres aplicaciones de silicio resultaron en concentraciones más altas de ácido fenólico ligado a glucosa comparado con el control sin tratar.

Se detectó que la incorporación de los fenoles a la pared celular varió de acuerdo a la estación del año. Sin embargo, los resultados indican que la aplicación de silicato de potasio induce a una menor unión de fenoles en la pared celular. Los análisis de datos por la separación de HPLC revelaron que todas las muestras de tratamientos contenían 3,4 - ácido hydroxibenzoico y vanillico. La presencia del ácido siríngico podría estar relacionada con la aplicación de silicio. El estudio provee la señal adicional de que los compuestos fenólicos se ven afectados por la aplicación de silicio. Los datos de este estudio no excluyen el hecho de que diversos mecanismos de resistencia mecánicos también podrían tener un papel importante y algo de sinergia podría darse en el sistema de defensa de la planta. Los resultados de este estudio suministran pruebas adicionales para la aplicación de silicio como medida alternativa de control para la pudrición de raíces de palto causada por *P.cinnamomi*.

Palabras claves: Silicio, *Phytophthora cinnamomi*, Aguacate, *Persea americana*, Putrefacción de la raíz

ACCUMULATION OF TOTAL PHENOLICS DUE TO SILICON APPLICATION IN ROOTS OF AVOCADO TREES INFECTED WITH *Phytophthora cinnamomi*

T. Bekker¹, T. Aveling², C. Kaiser¹, N. Labuschagne² and T. Regnier²

Department of Plant Production and Soil Science, ² Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, 0002, South Africa. Email: tbekker@tuks.co.za.

Accumulation of phenols and phenolic polymers in Persea americana Mill. roots exposed to the pathogen Phytophthora cinnamomi (Pc), and treated with potassium silicate was investigated during a field trial. The reported data indicates that potassium silicate application to avocado trees infected with Pc increase total phenolic content of root tissue. The trials consisted of three applications (Si x 3) during March 2005 and January 2006. Following elicitation, the conjugated and non-conjugated phenolic metabolites were found to be induced. Significantly higher crude phenolic concentrations are reported in Si x 3 during March and May 2006 when compared to potassium phosphonate (Avoquard ®) and three silicon applications resulted in higher glucoside bound phenolic acid concentrations compared to the untreated control. The integration of the phenolic into the cell wall was found to vary according to the season. However, results indicate that potassium silicate application leads to lower cell wall bound phenols. Data analysis by HPLC separation revealed that all treatments samples contained 3,4-hydroxibenzoic and vanillic acid. The presence of syringic acid could be related to the application of silicon. The study provides further indication that phenolic compounds are affected by silicon application. Data from this study does not excluded the fact that various mechanical resistance mechanisms could also play an important role and some synergism could take place in the plant's defence system. The results of this study provide further evidence for application of silicon as an alternative control measure for P. cinnamomi root rot of avocado.

Keywords: Silicon, *Phytophthora cinnamomi*, Avocado, *Persea americana*, Root rot

Introducción

Debido a la amenaza de la infección, plantas han desarrollado una multiplicidad de los productos químicos y de las estructuras que se incorporan en su tejido fino con el fin de la protección. Estas defensas pueden rechazar, disuadir, o intoxicar incluyendo follaje resina-cubierto o fibroso, conductos resina-llenados y cavidades, lignified o fenol-impregnaron las paredes de célula, y las células que contienen los fenoles o compuestos ante-microbianos de los análogos de la hormona (Chérif et al., 1994) los varios que son sintetizados por las plantas después de que se haya descubierto la infección. La mayoría de los compuestos phenolic son los phenyl-propanoids phenolic que son productos del camino ácido shikimic. Se previenen los hongos no patógenos inducen tales altos niveles de compuestos tóxicos en el anfitrión, ese su establecimiento, mientras que los hongos patógenos inducen solamente compuestos no tóxicos o degradan rápidamente los phytoalexins (Macheix et al., 1990; De Ascensao y Dubery, 2003). La acumulación rápida y temprana de compuestos phenolic en los sitios de la infección es una característica de las respuestas phenolic-basadas de la defensa. Esta acumulación de fenoles tóxicos puede dar lugar al aislamiento eficaz del patógeno en el sitio original de la entrada (De Ascensao y Dubery, 2003). El estudio actual fue iniciado para determinarse si el uso del silicato del

potasio a los aguacates pudo aumentar la concentración phenolic en tejido fino del aguacate. Esto confirmará la hipótesis que el silicio aumenta la concentración phenolic de los tejidos finos del anfitrión, dando por resultado la inhibición de la putrefacción de la raíz de *Phytophthora* en aguacates.

Materiales y Métodos

Disposición Experimental

Una huerta del aguacate (latitud 23° 43 ' 60S; la longitud 30°10'0E) en una altitud de los 847m fue seleccionada en el área de Tzaneen, Sudáfrica. Los árboles consistieron en los trece-año-viejos "Hass rizomas de la planta de semillero de" en "Duke7" plantados en una densidad de 204trees.ha-1 (7 los x 7m que espacian). Los árboles estaban en una cuesta meridional de los revestimientos. La disposición de ensayo consistió en 50 árboles (n) con 10 árboles asignados aleatoriamente por el tratamiento, y organizados en un diseño de bloque seleccionado al azar.

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en un tratamiento del suelo con una solución de 20 litros del silicato soluble del potasio 20ml.l-1 (dióxido) del silicio 20.7% (Bekker et al., 2005) por árbol cualquiera una vez, dos veces o tres veces en una estación de crecimiento. Los árboles inyectados con el phosphonate del potasio (Avoguard®) fueron incorporados como tratamiento estándar del fungicida. Los árboles un-tratado sirvieron como controles. Los datos fueron recogidos a partir de enero de 2005 a julio de 2006. Las muestras de la raíz y de la hoja fueron tomadas cada segundo mes en el lado norteño del árbol, y las muestras de la fruta fueron tomadas en la cosecha.

Extracción y Cuantificación de Compuestos Phenolic Totales

Las muestras fueron liofilizadas para 120h. El material secado fue molido con una amoladora básica de IKA® A11 (IKA Werke, GMBH y Co., kilogramo, D-79219 Staufen) a un polvo fino. Un mililitro de una mezcla fría del metanol: acetona: la solución del agua (7:7:1, v:v:v) fue agregada a la muestra pulverizada 0.05g de la planta, ultrasonified para los 5min y centrifugado según lo descrito por Regnier (1994) para obtener los extractos del petróleo bruto. Las muestras crudas fueron almacenadas en 4°C hasta la extracción. La extracción de ácidos phenolic no conjugados, Glucósido-Limita los ácidos phenolic, Ester-Limita los ácidos phenolic y la célula Pared-Limita los ácidos phenolic fue hecha según el método usado por De Ascensao y Dubery (2003). Una curva de calibración equivalente ácida gálica (y = 0.013x + 0.0177, R2 = 0.9982) fue utilizada para determinar la cantidad de cada fracción contenida en el material de la muestra. Los valores apuntados del extracto son representante de la cantidad relativa de cada fracción en el extracto crudo. Esto está en el acuerdo con funcionalidad ácida phenolic (Zhou *et al.*, 2004).

Cuantificación de Phenolics por el Método del Folin-Ciocalteau

La concentración de compuestos phenolic en los varios extractos fue determinada usando el reactivo del Folin-Ciocalteau. La cuantificación de concentraciones phenolic en los extractos fue hecha según lo descrito por Bekker (2007). Las fracciones phenolic extraídas eran analizadas por medio de

la fase reversa - cromatografía líquida del alto rendimiento (RP-HPLC) (Hewlett Packard Agilent 1100 series) con la detección del PAPÁ (detector del arsenal del diodo, 280, 325, los 340nm) según lo descrito por Bekker (2007). Análisis Estadístico

Los datos fueron sujetados al análisis de la variación (ANOVA). Las diferencias malas fueron separadas según la prueba múltiple de la gama de Duncan (P < 0.05).

Resultados y Discusión

Aunque las altas concentraciones fueron obtenidas en los extractos crudos. los valores crudos del extracto no reflejan los valores combinados de las cuatro otras fracciones ácidas phenolic extraídas con reacciones más específicas de la hidrólisis. Esto es porque los fenoles están limitados a las moléculas grandes en el citoplasma de la célula, y por la hidrólisis, estas moléculas son partidas, dando por resultado las concentraciones relevantes que son medidas. Durante el período que cosechaba (julio 2005 y de 2006), no se consideró ningunas diferencias significativas entre ningunos tratamientos en lo que respecta a concentraciones phenolic crudas. Para el período de marcha de 2005 a enero de 2006, tres usos del silicio (el silicio x 3) por la estación dio lugar a concentraciones phenolic totales perceptiblemente más altas en el tejido fino de la raíz comparado al control (cuadro 1). A partir de marcha a mayo de 2006, el tratamiento del control (133.66g.l⁻¹; 109.08g.l⁻¹) dado lugar a niveles phenolic crudos más altos comparó al silicio x 3 (94.61g.l-1; 67.98g.l-1). Aunque estos datos no correlacionan con cualesquiera de los parámetros del modelo phenological propuesto por Kaiser (1993), se propone que las tarifas metabólicas más bajas observadas en plantas eran debido a la actividad fisiológica bajada en la planta que conducía a la fotosíntesis sub-óptimo. Aunque el silicio x 3 dio lugar a concentraciones phenolic perceptiblemente más altas en aquacate arraiga solamente durante marcha y mayo de 2006 (94.61g.l⁻¹; 67.98g.l⁻¹) comparado al phosphonate del potasio (Avoguard®) (49.07g.l⁻¹; 59.46g.l⁻¹), el silicio x 3 es estadístico comparables al uso del phosphonate del potasio. Concentraciones ácidas phenolic encuadernadas del glucósido (cuadro 2) para el silicio x 3 diferenció perceptiblemente del control para el período enero a mayo de 2006. Las diferencias significativas entre estos dos tratamientos antes de enero 2006 fueron detectadas solamente durante mayo de 2005. Tres usos del silicio por la estación dieron lugar a una pared de célula perceptiblemente más baja que las concentraciones ácidas phenolic encuadernadas en aguacate arraigan (el cuadro 3) comparó al tratamiento del control durante mayo y sep. de 2005, y marcha y mayo de 2006. Esta tendencia fue negada durante enero de 2006 en que una concentración phenolic encuadernada perceptiblemente más alta de la pared de célula fue obtenida en el silicio x 3 (0.71g.l⁻¹) que el control (0.36g.l⁻¹). Aunque la tendencia no era constante en lo que concierne al silicio x 3, el tratamiento del phosphonate del potasio (Avoguard®) no diferenció del control a través del período probado. Tres tratamientos del silicio por la estación dieron lugar a fenoles encuadernados perceptiblemente más bajos de la pared de célula durante mayo, julio y sep. de 2005 y mayo 2006 comparado al silicio x 1, con concentraciones más altas obtenidas en el silicio x 3 solamente durante enero de

2006 (0.71g.l-1 contra. 0.38g.l-1). No se obtuvo ninguna diferencia significativa entre el silicio x 1 y el silicio x 3, excepto durante enero de 2006, cuando el silicio x 3 (0.71g. 1-1) dio lugar a fenoles encuadernados más altos de la pared de célula comparados al silicio x 2 (0.35g.l⁻¹). Los resultados indican que el uso del silicato del potasio conduce para bajar los phenolics encuadernados de la pared de célula. Sus resultados indicaron que la acumulación del silicio era subsiguiente al aspecto del fenol en tejido fino infectado, desafiador la barrera-hipótesis física que confiere la acumulación del silicio en paredes de célula de la planta en contacto cercano con el patógeno resistencia a la penetración fungicida por medios físicos. No se consideró ningunas diferencias significativas entre los tratamientos para las concentraciones phenolic encuadernadas del éster a través de la duración del ensayo (resultados no demostrados). Las concentraciones phenolic no conjugadas no diferenciaron perceptiblemente entre los tratamientos durante marcha, julio y sep. de 2005, y enero y marcha de 2006. Tres usos del silicio por la estación (1.62g.l⁻¹) y el phosphonate del potasio (Avoguard®) (2.44g.l⁻¹) dieron lugar a concentraciones no conjugadas perceptiblemente más bajas del fenol comparadas a la del control (2.80g.l⁻¹) solamente durante nov de 2005 (cuadro 4), mientras que las concentraciones entre el silicio x 3 y el phosphonate del potasio (Avoguard®) eran estadísticas similares. El uso del silicio a las plantas enfermas se ha demostrado al desarrollo y a la extensión de la enfermedad del control con varios grados de éxito (Epstein, 1999). Se acepta generalmente que las plantas con un contenido más alto de la silicona son más resistentes a los hongos phytopathogenic que esas plantas con un contenido más bajo (Ishiguro, 2001). Después de que el silicio sea tomado por una planta, pasa con un proceso del silicification, y se deposita en la pared de célula, el lumen de la célula, o los espacios intercelulares (Epstein, 1999). La microscopia electrónica y el análisis dispersivo de la radiografía condujeron Samuels et al. (1991) y Chérif et al. (1992) a concluir que las reacciones realzadas de la defensa en la planta del pepino al ataque fungicida aparecen ser el resultado del silicio presente en la corriente de la transpiración de las plantas, y no porque se limita a la pared de célula de la planta. Aunque Menzies et al. (1991) juzgaban la posibilidad de silicification de las paredes de célula como no ser desechado totalmente, el silicio es más probable afectar señalar entre el anfitrión y el patógeno, dando por resultado una activación más rápida de los mecanismos de defensa de los anfitriones. Heath (1981) divulgó que la acumulación del silicio como respuesta a la infección no está limitada al silicio que acumula las plantas (Epstein, 1999). Heath y Stumpf (1986) sugirieron los altos niveles de phenolics pared-asociados en tejido fino silicio-agotado para dar lugar a una inhibición más rápida de las enzimas fungicidas implicadas en la formación fungicida-penetrante de la clavija. Los resultados del estudio actual indican que el uso del silicato del potasio a los aguacates conduce a las concentraciones phenolic de un extracto crudo más alto pero a phenolics encuadernados más bajos de la pared de célula comparados al control. La acumulación del silicio era subsiguiente al aspecto del fenol en el tejido fino infectado, desafiador la barrera-hipótesis física que confiere la acumulación del silicio en paredes de célula de la planta en contacto cercano con el patógeno resistencia a la penetración fungicida por medios físicos. El uso del silicio a los aquacates dio lugar a pocos fenoles identificables en las raíces

del aguacate comparadas a los tratamientos del control y del phosphonate del potasio. La separación del HPLC de los ácidos phenolic hidrolizados extraídos de raíces reveló que todas las muestras ácidas phenolic no conjugadas contienen el ácido 3,4-hydroxibenzoic. Las muestras encuadernadas hidrolizadas del glucósido de los tratamientos del phosphonate y del control del potasio también contuvieron el ácido 3,4-hydroxibenzoic y el ácido vanillic. El tratamiento del control contuvo el ácido syringic en el extracto encuadernado hidrolizado del glucósido.

Conclusión

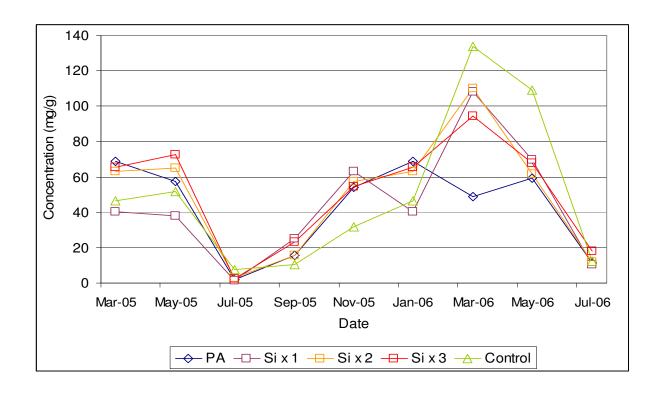
La acumulación de fenoles y de polímeros phenolic en las raíces Persea americana expuso a los elicitors derivados de la pared de célula del P. cinnamomi el patógeno, y trató con el silicato soluble en agua del potasio, fue investigada. Estos resultados apoyan la hipótesis los resultados de ese uso del silicio en resistencia aumentada contra la infección del P. cinnamomi vía una elevación de niveles phenolic en las raíces. Aunque las concentraciones phenolic crudas diferenciaron entre los tratamientos y ninguna deducción clara puede ser echo referente al efecto del silicato del potasio en el contenido phenolic del aguacate arraiga en la presencia del P. cinnamomi, está claro que las concentraciones phenolic similares o más arriba crudas están obtenidas en raíces del aquacate con tres usos del silicato por la estación comparada a los árboles tratados phosphonate del potasio. Esto era también verdad para el glucósido que las concentraciones phenolic encuadernadas en raíces de árboles trataron el tiempo tres por la estación con silicio del potasio (el silicio x 3) comparó a los árboles tratados phosphonate del potasio. En este estudio el uso del silicato del potasio conduce para bajar los phenolics encuadernados de la pared de célula. La posibilidad que el silicio substituya las moléculas fenol-que atan no se entiende completamente. Sin embargo, este estudio indica que la acumulación del silicio era subsiguiente al aspecto del fenol en tejido fino infectado; desafiador la barrera física y el conferir a la pared de célula en contacto cercano con el patógeno unan cierta resistencia a la penetración fungicida por medios físicos. La búsqueda futura en el uso del silicio por lo tanto se puede mantener con esta estrategia para controlar enfermedad de planta en general y enfermedades de la raíz del aguacate en detalle.

Literatura Citada

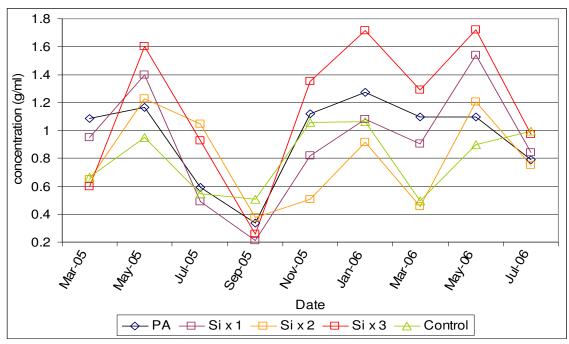
BEKKER, T.F., 2007. Efficacy of water soluble silicon for control of *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. MSc thesis, Department of Horticulture, University of Pretoria, South Africa.

BEKKER, T.F., KAISER, C., VAN DER MERWE, R., & LABUSCHAGNE, N., 2006. *In-vitro* inhibition of mycelial growth of several phytopathogenic fungi by soluble silicon. *S.A. J. Plant Soil* 26(3), 169-172.

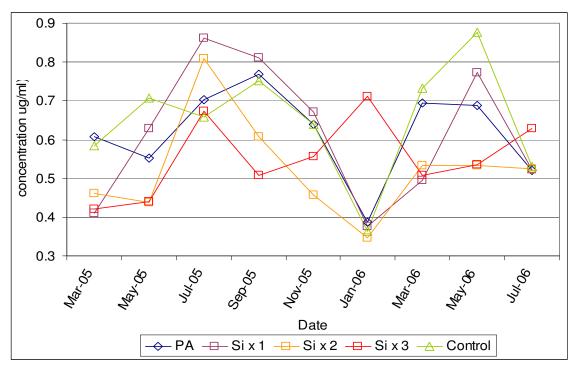
- CHÉRIF, M., ASSELIN, A. & BELANGER, R.R., 1994. Defence responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathol.* 84, 236-242.
- CHÉRIF, M., BENHAMOU, N., MENZIES, J.G. & BÉLANGER, R.R., 1992. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum. Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41, 411-415.
- DE ASCENSAO, A.R.F.D.C. & DUBERY, I.A., 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochem*. 63, 679-686.
- EPSTEIN, E., 1999. Silicon. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 641-664
- HEATH, M.C., 1981. Insoluble silicon in necrotic cowpea cells following infection with an incompatible isolate of the cowpea rust fungus. *Physiol. Plant Pathol.* 19, 273-276.
- HEATH, M.C. & STUMPF, M.A., 1986. Ultrastructural observations of penetration sites of the cowpea rust fungus in untreated and silicon depleted French bean cell. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 29, 27-39.
- ISHIGURO, K., 2001. Review of research in Japan on the roles of silicon in conferring resistance against rice blast. In: Silicon in Agriculture, L.E. Datnoff, G.H. Snyder and G.H. Korndorfer (Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 277-291.
- KAISER, C., 1993. Some physiological aspects of delayed harvest of 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.) in the Natal midlands. MSc thesis, Department of Horticulture, Pietermaritzburg, South Africa, pp 97.
- MACHEIX, J-J., FLEURIET, A. & BILLOT, J., 1990. Fruit Phenolics. CRC Press, Paris, pp 1.
- MENZIES, J., BOWEN, P., EHRET, D. & GLASS, A.D.M., 1991. Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon and zucchini squash. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117, 902-905.
- REGNIER, T. 1994. Les composés phénoliques du blé dur (<u>Triticum turgidum L. var. durum</u>): Variations au cours du developpement et de la maturation du grain, relations avec l'apparition de la moucheture. PhD Thesis, pp. 43 45. Montpellier University. France.
- SAMUELS, A.L., GLASS, A.D.M., EHRET, D.L. & MENZIES, J.G., 1991. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. *Plant Cell Environ*. 14, 485-492.
- ZHOU, Z., ROBARDS, K., HELLIWEL, S. & BLANCHARD, C., 2004. The distribution of phenolics in rice. *Food Chem.* 87, 401 406.



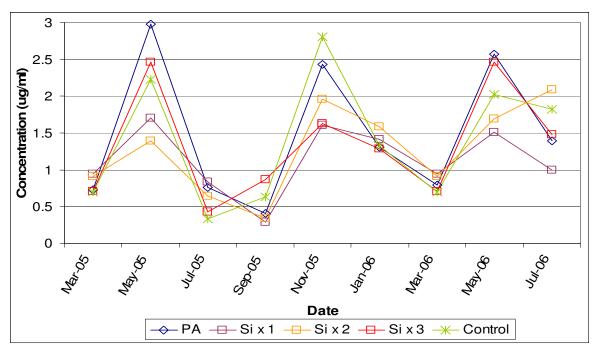
Cuadro 1: El contenido phenolic soluble total de las raíces del aguacate se recuperó durante 18 meses en los árboles infectados *P. cinnamomi*, que eran cualquier un tratado (los controles) o tratado con el silicato del potasio como tratamiento del suelo. Los tratamientos consistieron en uno (el silicio x 1), dos (el silicio x 2) o tres (los usos del silicato del potasio del silicio x 3) por la estación; árboles inyectados con el phosphonate del potasio (PA) y árboles que no reciben ningún tratamiento como tratamiento del control. Los valores en tabla con diversos símbolos indican diferencias significativas en un nivel del 95% de la significación (t-prueba del estudiante). Concentración phenolic expresada como ácido gálico del magnesio equivalente por gramo de peso seco.



Cuadro 2: Concentración total del ácido phenolic del límite del glucósido después de que la hidrólisis de las raíces del aguacate se recuperara durante 18 meses en los árboles infectados *P. cinnamomi*, que eran cualquier un tratado (los controles) o tratado con el silicato del potasio como tratamiento del suelo. Los tratamientos consistieron en uno (el silicio x 1), dos (el silicio x 2) o tres (los usos del silicato del potasio del silicio x 3) por la estación; árboles inyectados con el phosphonate del potasio (PA) y árboles que no reciben ningún tratamiento como tratamiento del control. Los valores en tabla con diversos símbolos indican diferencias significativas en un nivel del 95% de la significación (t-prueba del estudiante). Concentración phenolic expresada como ácido gálico del magnesio equivalente por gramo de peso seco.



Cuadro 3: Concentración total del ácido phenolic encuadernado de la pared de célula después de que la hidrólisis de las raíces del aguacate se recuperara durante 18 meses en los árboles infectados *P. cinnamomi*, que eran cualquier un tratado (los controles) o tratado con el silicato del potasio como tratamiento del suelo. Los tratamientos consistieron en uno (el silicio x 1), dos (el silicio x 2) o tres (los usos del silicato del potasio del silicio x 3) por la estación; árboles inyectados con el phosphonate del potasio (PA) y árboles que no reciben ningún tratamiento como tratamiento del control. Los valores en tabla con diversos símbolos indican diferencias significativas en un nivel del 95% de la significación (t-prueba del estudiante). Concentración phenolic expresada como ácido gálico del magnesio equivalente por gramo de peso seco.



Cuadro 4: Concentración total de los phenolics no conjugados ácidos después de que la hidrólisis de las raíces del aguacate se recuperara durante 18 meses en los árboles infectados *P. cinnamomi*, que eran cualquier un tratado (los controles) o tratado con el silicato del potasio como tratamiento del suelo. Los tratamientos consistieron en uno (el silicio x 1), dos (el silicio x 2) o tres (los usos del silicato del potasio del silicio x 3) por la estación; árboles inyectados con el phosphonate del potasio (PA) y árboles que no reciben ningún tratamiento como tratamiento del control. Los valores en tabla con diversos símbolos indican diferencias significativas en un nivel del 95% de la significación (t-prueba del estudiante). Concentración phenolic expresada como ácido gálico del magnesio equivalente por gramo de peso seco.