



Biochemical profile of avocado (*Persea americana* Mill) foliar tissue and its relationship with susceptibility to mistletoe (Family Loranthaceae)

Perfil bioquímico de tejido foliar de aguacate (*Persea americana* Mill) y su relación con la sensibilidad al ataque de muérdago (Familia Loranthaceae)

Guzmán-Rodríguez, L. F.^{1*}, Cortés-Cruz, M. A.¹, Rodríguez-Carpena, J. G.², Coria-Ávalos, V. M.³, Muñoz-Flores, H. G.³.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro Nacional de Recursos Genéticos. Boulevard de la Biodiversidad 400, Col. Rancho las Cruces, Tepatitlán de Morelos, C.P. 47600, Jalisco, México.

²Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología. Av. Emiliano M. González S/N, Ciudad del Conocimiento, Col. Ciudad Industrial. C.P. 63173, Tepic, Nayarit, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Uruapan. Av. Latinoamericana No. 1101, Col. Revolución, C.P. 60080. Uruapan, Michoacán, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Guzmán-Rodríguez, L. F., Cortés-Cruz, M. A., Rodríguez-Carpena, J. G., Coria-Ávalos, V. M., Muñoz-Flores, H. G. (2020). Biochemical profile of avocado (*Persea americana* Mill.) foliar tissue and its relationship with susceptibility to mistletoe (Family Loranthaceae). *Revista Bio Ciencias* 7, e492. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e492>



ABSTRACT

The avocado *drymifolia* is sensitive to the attack of mistletoe, while, "Hass" and "Mendez" exhibit tolerance. This difference could be related to the secondary metabolites produced by the plant. The biochemical profile of *drymifolia*, Hass and Mendez avocados was determined, as well as the relationship with mistletoe sensitivity/tolerance. Twenty-seven *drymifolia* individuals, one Hass and one Mendez, from three localities of Michoacan, Mexico, were evaluated. The extraction and analysis of the volatile compounds were carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry and the results were compared with the spectra of the NIST library. The most abundant secondary metabolites were estragole, caryophyllene, (+)-4-carene and γ -terpinene, with 95.0, 88.0 and

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 17th 2018.

Accepted/Aceptado: August 11st 2019.

Available on line/Publicado: October 11st 2019.

RESUMEN

El aguacate *drymifolia* es sensible al ataque de muérdago, mientras, "Hass" y "Méndez" presentan tolerancia. Esta diferencia podría estar relacionada con los metabolitos secundarios producidos por la planta. Se determinó el perfil bioquímico de aguacates *drymifolia*, "Hass" y "Méndez", y la relación con la sensibilidad/tolerancia al muérdago. Se evaluaron 27 individuos *drymifolia*, un "Hass" y un "Méndez" de tres localidades de Michoacán, México. La extracción y análisis de los compuestos volátiles se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y los resultados se compararon con los espectros de la biblioteca NIST. Los compuestos más abundantes fueron estragol, cariofileno, (+)-4-careno y γ -terpineno, con 95.0, 88.0 y 90.1 %, del total de 116 compuestos identificados, en *drymifolia*, "Hass" y "Méndez", respectivamente. En aguacate "Hass" se identificaron 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H-2,4a-etanonaftaleno (0.84 %), α -cubebeno (0.33 %), 2,4,6-ácido octatrienoico (0.24 %) y α -felandreno (0.21 %) y en "Méndez", timol

*Corresponding Author:

Luis Felipe Guzmán Rodríguez. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro Nacional de Recursos Genéticos. Boulevard de la Biodiversidad 400, Col. Rancho las Cruces, Tepatitlán de Morelos, C.P. 47600, Jalisco, México. Phone: +52(800) 088 2222 ext. 84823. E-mail: guzman.luis@inifap.gob.mx

90.1 %, of the total of 116 compounds identified, in *drymifolia*, Hass and Mendez, respectively. In avocado Hass 1,3,4,5,6,7-hexahydro-2,5,5-trimethyl-2H-2,4a-ethanonaphthalene (0.84 %), α -Cubebene (0.33 %), 2,4,6-octatrienoic acid (0.24 %) and α -phellandrene (0.21 %) were identified and in Mendez, thymol (0.06 %) but these compounds were not identified in any avocado *drymifolia*. In addition, 2,5-bisbenzaldehyde showed 21.7X and 19.7X times more concentration in Hass and Mendez, respectively, than in *drymifolia*. The avocado *drymifolia* presented more secondary metabolites, but the most abundant compounds were shared in the three varieties. The secondary metabolites not found in avocado *drymifolia* could be related to mistletoe tolerance.

KEY WORDS

Mexican creole avocado, Hass avocado, Mendez avocado, secondary metabolites, mistletoe.

Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) is classified into three botanical races or varieties, according to the morphological characteristics of the fruit: *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* var. *guatemalensis* and *P. americana* var. *americana* (Guzmán *et al.*, 2017; Ferrer-Pereira *et al.*, 2017). Mexican criollo avocado belongs to *drymifolia* variety or Mexican landrace (Ayala & Ledezma, 2014). In addition, commercial varieties have been developed from crosses between landraces, such as the "Hass" avocado, which is a hybrid with predominantly *guatemalensis* and *drymifolia* features (Tremocoldi *et al.*, 2018) while, "Fuerte" avocado is a hybrid of the *drymifolia* x *guatemalensis* varieties (Crane *et al.*, 2013). Avocado is of great commercial importance due to the consumption of the fruit as food worldwide (Peraza-Magallanes *et al.*, 2017; Ferrer-Pereira *et al.*, 2017).

On the other hand, mistletoe (Family Loranthaceae) is a hemiparasitic tree plant with a wide distribution in urban and wooded areas (Díaz-Limón *et al.*, 2016; Watson, 2017). In Mexico, mistletoe has a high harmful impact on the development and growth of forest and fruit trees

(0.06 %) pero en ningún individuo *drymifolia*. Además, 2,5-bisbenzaldehído tuvo 21.7X y 19.7X, veces más abundancia en "Hass" y "Méndez", respectivamente, que en *drymifolia*. El aguacate *drymifolia* presentó mayor cantidad de metabolitos secundarios, pero los compuestos más abundantes fueron compartidos en las tres variedades. Los compuestos no detectados en aguacate *drymifolia* podrían estar relacionados con la tolerancia a muérdago.

PALABRAS CLAVE

Aguacate Criollo Mexicano, Hass y Méndez, metabolitos secundarios, muérdago.

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) se clasifica en tres razas botánicas o variedades, de acuerdo a las características morfológicas del fruto: *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* var. *guatemalensis* y *P. americana* var. *americana* (Guzmán *et al.*, 2017; Ferrer-Pereira *et al.*, 2017). El aguacate criollo mexicano pertenece a la variedad *drymifolia* o raza mexicana (Ayala & Ledezma, 2014). Además, variedades comerciales se han generado a partir de cruces entre las razas, como el aguacate "Hass", el cual es un híbrido con predominio *guatemalensis* y rasgos de *drymifolia* (Tremocoldi *et al.*, 2018) mientras, el aguacate fuerte es un híbrido de las variedades *drymifolia* x *guatemalensis* (Crane *et al.*, 2013). El aguacate tiene gran importancia comercial debido al consumo del fruto como alimento a nivel mundial (Peraza-Magallanes *et al.*, 2017; Ferrer-Pereira *et al.*, 2017).

Por otra parte, el muérdago (Familia Loranthaceae) es una planta hemiparásita de árboles con amplia distribución en zonas urbanas y forestales (Díaz-Limón *et al.*, 2016; Watson, 2017). En México, el muérdago tiene un alto impacto nocivo sobre el desarrollo y crecimiento de los árboles forestales y frutales y la susceptibilidad a otras enfermedades (Azpeitia & Lara, 2006).

En aguacate de manera particular, se ha observado la afectación principalmente, a árboles var. *drymifolia* (Coria *et al.*, 2015), a pesar de ser resistente a plagas e incluso ser utilizado como portainjertos de otras variedades (Rincón-Hernández *et al.*, 2011) mientras, las variedades comerciales "Hass" y "Méndez" presentan tolerancia al ataque de muérdago (Coria *et al.*, 2015).

and their susceptibility to other diseases (Azpeitia & Lara, 2006).

In avocado, in particular, damage has been observed mainly on trees of the var *drymifolia* (Coria et al., 2015), despite being resistant to pests and even being used as rootstocks for other varieties (Rincón-Hernández et al., 2011), while the commercial varieties "Hass" and "Mendez" display tolerance to the mistletoe attack (Coria et al., 2015).

A plant defense mechanism is the synthesis of chemical substances, known as secondary metabolites, for protection against invasive biological agents (Torres-Gurrola et al., 2011; Medina-Carrillo et al., 2017). A great variety of these compounds have been identified as useful for adaptation and survival of the plant, but are not essential for surviving (Wolfender et al., 2015; Lui et al., 2017). Some authors mention the hypothesis that plants that have a more significant amount and combination of secondary metabolites (SM) may have greater protection against pathogens and that it could be due to a specific compound or a mixture of several (Medina-Carrillo et al., 2017). However, Torres-Gurrola et al. (2011) reject the positive relationship between the diversity of chemical compounds and the defense against pathogens.

Because of the commercial importance of avocado at international level and the mistletoe attack against *drymifolia* avocado trees, used as rootstocks for their resistance to pests and diseases, the objective of this work was to evaluate the biochemical profile of *drymifolia*, "Hass" and "Mendez" avocados in order to make an exploration of secondary metabolites possibly related to mistletoe tolerance (Family Lanthaceae).

Material and Methods

In the present work, 27 *drymifolia* avocados, a Hass avocado and a Méndez avocado were studied, coming from four localities of Michoacan, which are, 11 from Ziracuaretiro, 10 from Tingambato, six from Uruapan and two from Cutzato. The avocado orchard has a age of 15 years. The diameter of the plants at the base is approximately 20-25 cm and is handled under a system conventional, with micro sprinkler irrigation.

Un mecanismo de defensa de las plantas es la síntesis de sustancias químicas, conocidas como metabolitos secundarios, para la protección contra agentes biológicos invasores, (Torres-Gurrola et al., 2011; Medina-Carrillo et al., 2017). Se han identificado gran variedad de estos compuestos que sirven para la adaptación y supervivencia de la planta, pero no son esenciales para la vida (Wolfender et al., 2015; Liu et al., 2017). Algunos autores mencionan la hipótesis de que las plantas que presentan mayor cantidad y combinación de metabolitos secundarios (SM) podrían tener una mayor protección contra patógenos, y que podría deberse a algún compuesto en específico o bien, una combinación de varios (Medina-Carrillo et al., 2017), no obstante, Torres-Gurrola et al. (2011) rechazan la relación positiva entre la diversidad de compuestos químicos y la defensa contra patógenos.

Derivado de la importancia comercial del aguacate a nivel internacional y del problema que representa el ataque de la planta parásita muérdago contra árboles de aguacate *drymifolia*, utilizados como portainjertos y poseedores de genes de resistencia a plagas y enfermedades. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil bioquímico de aguacates *drymifolia*, "Hass" y "Méndez", con el fin de hacer una exploración a metabolitos secundarios posiblemente relacionados con la tolerancia al muérdago (Familia Lanthaceae).

Material y Métodos

En el presente trabajo, se estudiaron 27 árboles de aguacate var. *drymifolia*, un árbol de la variedad "Hass" y un árbol de la variedad "Méndez", procedentes de cuatro localidades de Michoacán, los cuales son 11 de Ziracuaretiro, 10 de Tingambato, seis de Uruapan y dos de Cutzato. El huerto de aguacate tiene una edad de 15 años. El diámetro de las plantas a la base es de aproximadamente 20-25 cm y es manejada bajo un sistema convencional, con riego por microaspersión.

Las hojas maduras fueron colectadas de árboles de aguacate establecidos en huertos comerciales y árboles de traspatio, las cuales, se conservaron a 4 °C hasta su traslado al laboratorio. Se tomaron de 5 a 7 hojas jóvenes y sanas. Se consideró como unidad experimental al árbol de aguacate.

El aislamiento de los metabolitos secundarios se realizó por microextracción en fase sólida (SPME) en un vial de extracción de 10 mL con 200 mg de tejido foliar, al que se

Mature leaves were collected from avocado trees established in commercial orchards and backyard trees, which were kept at 4 °C until they were transferred to the laboratory. Five to seven young and healthy leaves were sampled. Each avocado tree was considered as an experimental unit.

Secondary metabolite isolation was performed by solid-phase microextraction (SPME) in a 10 mL extraction vial with 200 mg of leaf tissue. Before metabolite extraction, the midrib and secondary veins were removed. The leaf was finely chopped with a scalpel. The determination of volatile compounds was accomplished by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS).

For the adsorption of volatile compounds, a divinylbenzene/carboxy/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber of 50/30 μm StableFlex/SS (1cm) (Supelco 57298-U) was used. The desorption was carried out in a BRUKER SCION 456-GC gas chromatograph with CombiPAL autosampler, equipped with a programmed temperature vaporization injector (PTV). Also, an HP-5MS Agilent 60 m $\times$ 0.250 mm $\times$ 0.25 μm capillary column (19091S-436) and a quadrupole single mass detector of the BRUKER SQ were used.

The injection sequence was programmed by preheating the fiber at 220 °C. For the adsorption of volatile compounds with DVB/CAR/PDMS fiber, a specialized automated SPME attachment integrated to the chromatograph autosampler was used; which allowed incubating the chopped leaf sample with the exposed fiber in the head space at 37 °C for 10 min with intermittent shaking at 250 rpm and cycles of 2 s turned on and 4 s turned off, to achieve the highest release of volatile compounds.

Afterward, the fiber performed the desorption of the analytes in the PTV injector at 180 °C for 2 min. The temperature ramp used in the GC was 50 °C for 3 min, 120 °C at 5 °C/min for 3 min and 240 °C at 5 °C/min for 7 min. Ultrapure grade helium was used as a carrier gas at a flow rate of 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹. Finally, the analytes were identified by comparing the mass spectra reported in the NIST (Mass Spectral Search Program) Version 2.0 library included in the software.

Results and Discussion

In the analysis of the biochemical profile of the leaf tissue of avocado trees var. *drymifolia*, 111

eliminó el nervio central y las nervaduras secundarias. El resto de la hoja fue picado finamente con bisturí, y la determinación de los compuestos volátiles se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Para la extracción por adsorción de compuestos volátiles, se empleó una fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 μm StableFlex/SS (1cm) (Supelco 57298-U). La desorción se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases marca BRUKER SCION 456-GC con automuestreador CombiPAL, equipado con un inyector de vaporización de temperatura programada (PTV). Además, se utilizó una columna capilar HP-5MS Agilent 60 m $\times$ 0.250 mm $\times$ 0.25 μm (19091S-436) y detector de masas simple cuádruplo de la marca BRUKER SQ.

La programación de la secuencia de inyección se realizó por precalentamiento de la fibra a 220 °C. Para la adsorción de los compuestos volátiles con la fibra de DVB/CAR/PDMS, se utilizó un aditamento automatizado especial para SPME integrado al automuestreador del cromatógrafo; el cual permitió incubar la muestra foliar picada con la fibra expuesta en el espacio de cabeza a 37 °C durante 10 min con agitación intermitente a 250 rpm y ciclos de 2 s de encendido y 4 s de apagado para lograr la liberación de la mayor cantidad de compuestos volátiles.

Después, la fibra realizó la desorción de los analitos en el inyector PTV a 180 °C durante 2 min. La rampa de temperatura utilizada en el GC fue de 50 °C por 3 min, 120 °C a 5 °C/min por 3 min y 240 °C a 5 °C/min durante 7 min.

Helio grado Ultrapure con un flujo 0.8 mL/min fue utilizado como gas acarreador. Finalmente, la identificación de los analitos se realizó comparando los espectros de masas reportados en la biblioteca NIST (Mass pectral Search Program) Versión 2.0 incluida en el software de equipo.

Resultados y Discusión

En el análisis del perfil bioquímico del tejido foliar de árboles de aguacate var. *drymifolia* se detectaron 111 diferentes compuestos, en el árbol de la variedad "Hass" fueron 25 compuestos y en el árbol de la variedad "Méndez" fueron 29 compuestos. (Tabla 1).

Se identificó una cantidad mayor de metabolitos secundarios en los árboles de aguacate var. *drymifolia*, en comparación con reportes previos. Torres-Gurrola et

different compounds were detected, in the tree of the variety "Hass" were 25 and in the tree of the variety "Mendez" 29 compounds (Table 1).

A greater number of secondary metabolites (SM) was identified in avocado trees var. *drymifolia*, compared to previous reports. Torres-Gurrola *et al.* (2011) determined the biochemical profile of *drymifolia* avocado trees in leaf tissue, to identify the relationship with the incidence of gall-forming insects, in which they reported 33 secondary metabolites. In another study on the chemical composition of *drymifolia* avocado trees, from the germplasm banks in Uruapan, Cupatitzio and Apatzingán, in the State of Michoacán, 64 compounds in 247 trees evaluated were reported (Rincón-Hernández *et al.*, 2011).

In "Hass" avocado trees, a smaller number of SM was identified (25), compared to a previous study, in which 34 compounds were detected in the volatile fraction of the hexane extract of foliar tissue, of which 32 were identified and two were not identified. (García-Rodríguez *et al.*, 2016). On the other hand, so far there are no reports in the literature related to secondary metabolites identified in leaf tissue of avocado trees "Mendez".

On average, four secondary metabolites were the most abundant in the *drymifolia*, "Hass" and "Mendez" varieties.

The relative concentrations of these compounds are: estragole 61.2, 68.0 and 81.5 %, karyophyllene 19.4, 5.2 and 3.2 %, (+) - 4-carene 7.5, 6.8 and 2.7 % and γ -terpinene 6.9, 8.0 and 2.7 % in varieties *drymifolia*, "Hass" and "Mendez", respectively (Table 1). These four compounds represent the 95.0, 88.0 and 90.1 %, of the total SM identified in the volatile profile of avocado leaf tissue for *drymifolia*, "Hass" and "Mendez" avocados, respectively. The high similarity in the observed abundance of these four compounds, among the varieties of avocado studied, suggests that the possible mistletoe tolerance could be related to other compounds or factors.

For avocado *drymifolia*, Rincón-Hernández *et al.* (2011) reported the presence of estragole (75-86 %), β -caryophyllene (1.4-3.1 %), β -pinene (1.3-1.8 %) and α -pinene (0.8-1.5 %).

In the case of the «Hass» variety, García-Rodríguez *et al.* (2016), reported a lower abundance of estragole, on average 1.7 %, compared with the 68.0 % reported in

al. (2011) determinaron el perfil bioquímico de árboles de aguacate *drymifolia* en tejido foliar, para identificar la relación con la incidencia de insectos formadores de agallas, en el cual, reportaron 33 metabolitos secundarios. En otro estudio sobre la composición química de árboles de aguacate *drymifolia*, de los bancos de germoplasma en Uruapan, Cupatitzio y Apatzingán, en el Estado de Michoacán, reportan 64 compuestos en 247 árboles evaluados (Rincón-Hernández *et al.*, 2011).

En árboles de aguacate "Hass" se identificaron una cantidad menor de SM (25), en comparación con un estudio previo, en el cual, 34 compuestos fueron detectados en la fracción volátil del extracto hexánico de tejido foliar, de los cuales 32 fueron reconocidos y dos no fueron identificados. (García-Rodríguez *et al.*, 2016).

Por otra parte, hasta este momento no existen reportes en la literatura relacionados con metabolitos secundarios identificados en tejido foliar de árboles de aguacate "Méndez".

En promedio, cuatro metabolitos secundarios fueron los más abundantes en la variedad *drymifolia*, de igual manera que en los árboles de las variedades "Hass" y "Méndez". Las concentraciones relativas de estos compuestos son: estragol 61.2, 68.0 y 81.5 %, cariofileno 19.4, 5.2 y 3.2 %, (+)-4-careno 7.5, 6.8 y 2.7 % y γ -terpineno 6.9, 8.0 y 2.7 % en las variedades *drymifolia*, "Hass" y "Méndez", respectivamente (Tabla 1). Estos cuatro compuestos representan 95.0, 88.0 y 90.1 %, en aguacate *drymifolia*, "Hass" y "Méndez", respectivamente, del total de metabolitos secundarios identificados en el perfil volátil del tejido foliar de aguacate. La alta similitud de en la abundancia observada de estos cuatro compuestos, entre las variedades de aguacate estudiadas, sugiere que la posible tolerancia a muérdago podría estar relacionada con otros compuestos o factores.

En el trabajo de Rincón-Hernández *et al.* (2011) reportan abundancia de estragol en un rango de 75 a 86 %, β -cariofileno, en un rango de 1.4 a 3.1 %, β -pineno, en un rango de 1.3 a 1.8 % y α -pineno, en un rango de 0.8 a 1.5 %, en árboles de la variedad *drymifolia*.

De manera contraria, en la variedad "Hass", García-Rodríguez *et al.* (2016), reportaron menor abundancia de estragol, en promedio 1.7 %, en comparación con el 68.0 % reportado en el presente trabajo. En cambio, los compuestos persin (17.9 %), 2-[(8Z, 11Z)-heptadeca-8,11-

Table 1.
Relative concentration of the secondary metabolites identified in *drymifolia*, Hass and Méndez avocado leaves, susceptible and tolerant to mistletoe.

Tabla 1.
Concentración relativa de metabolitos secundarios identificados en hojas de aguacates *drymifolia*, “Hass” y “Méndez”, susceptibles y tolerantes a muérdago.

#	Secondary Metabolites identified	<i>drymifolia</i> Average conc. (%)	Hass Conc. (%)	Mendez Conc. (%)
1	Estragole	61.173	67.997	81.520
2	Caryophyllene	19.398	5.211	3.230
3	(+)-4-carene	7.532	6.835	2.676
4	γ-terpinene	6.929	7.998	2.655
5	o-cymene	1.154	1.819	0.781
6	Copaene	1.522	1.664	1.347
7	Benzaldehyde, 2,5-bis	0.069	1.500	1.360
8	Caryophyllene oxide	0.404	0.996	0.424
9	2H-2,4a-Ethanonaphthalene, 1,3,4,5,6,7-hexahydro-2,5,5-trimethyl-	*	0.835	*
10	β-phellandrene	0.187	0.730	0.344
11	Methyl eugenol	0.273	0.626	1.610
12	α-terpinene	0.497	0.568	0.243
13	β-cubebene	0.997	0.564	0.186
14	Anethole	1.922	0.367	0.351
15	α-cubebene	*	0.327	*
16	α-copaene	0.337	0.322	0.209
17	2,4,6-octatrienoic acid	*	0.237	*
18	2-carene	0.151	0.219	*
19	β-copaene	0.049	0.213	*
20	α-phellandrene	*	0.206	*
21	Eucalyptol	0.266	0.182	0.096
22	β-guaiene	0.026	0.176	0.138
23	Naphthalene, 2-methyl-	0.074	0.172	0.070
24	Naphthalene, 6-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-	0.131	0.165	0.090
25	Naphthalene, 1-methyl-	0.029	0.071	*
26	Isolongifolene	1.232	*	0.738
27	Humulene	1.529	*	0.454
28	Methyl benzoic dodecyl ester, 2,6-difluoro-3-acid	0.479	*	0.321
29	Isodene	0.736	*	0.314
30	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6,8-trimethyl-	0.254	*	0.276
31	β-cadinene	0.113	*	0.247

32	(±) cadinene	0.017	*	0.092
33	Thymol	*	*	0.063
34	α-elemene	0.131	*	0.062
35	(-)-aristolene	0.087	*	0.055
36	δ-selinene	0.096	*	0.051
37	(+)-epi-bicyclosesquiphellandrene	1.335	*	*
38	Limonene	1.138	*	*
39	2 5-bis (trimethylsilyl)oxy benzaldehyde	0.945	*	*
40	β-pinene	0.337	*	*
41	1,4-Benzenediol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.279	*	*
42	Naphthalene, 2-buthyldecahydro	0.201	*	*
43	Mesitylene	0.196	*	*
44	Hydroxyacetophenone, 3,5-di-tert-butyl-4-	0.140	*	*
45	(±) cadinene, 1,4-benzenediol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.183	*	*
46	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro- 1,5-dimethyl-	0.166	*	*
47	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethyl-	0.156	*	*
48	(-)-calamenene	0.144	*	*
49	(+)-2-bornanone	0.144	*	*
50	Morpholine, 4-octadecyl-	0.140	*	*
51	1,3-cyclopentadiene, 1,2,3,4,5-pentamethyl-	0.135	*	*
52	Aromadendrene oxide(2) / aristotele epóxide	0.121	*	*
53	Benzene 1,2,3,5-tetramethyl-	0.063	*	*
54	α-ylangene	0.117	*	*
55	Benzene 1,2,4,5-tetramethyl-	0.058	*	*
56	Naphthalene	0.104	*	*
57	Isolongifolene, 4,5,9,10-dehydro-	0.086	*	*
58	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	0.084	*	*
59	γ-terpineol	0.081	*	*
60	p-cimene	0.070	*	*
61	γ-murolene	0.068	*	*
62	(+)-δ-cadinene	0.067	*	*
63	Benzene, 1,3-dichloro-	0.065	*	*
64	α-cadinene	0.064	*	*
65	Octanoic acid methyl ester	0.063	*	*
66	Calarene	0.063	*	*
67	Nootkatone	0.057	*	*
68	Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	0.055	*	*
69	Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl-	0.054	*	*

70	Agarospirol / Ciperene	0.051	*	*
71	Naphthalene, 1-isocyano-	0.051	*	*
72	Linalool	0.048	*	*
73	Naphthalene, 5-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-	0.046	*	*
74	Calarene epoxide	0.044	*	*
75	Benzaldehyde, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-	0.040	*	*
76	β -neoclovene	0.040	*	*
77	Benzene, 1-ethyl-2,4-dimethyl-	0.034	*	*
78	4-epi-cubedol	0.037	*	*
79	Benzene, 1-methyl-4-propyl-	0.029	*	*
80	Thujopsene-(i2)	0.027	*	*
81	Aristolene epoxide	0.026	*	*
82	Ledene alcohol	0.025	*	*
83	Benzene, 1,2,4-trimethyl-	0.022	*	*
84	α -longipinene	0.020	*	*
85	Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	0.043	*	*
86	5-dodecanol acetate	0.015	*	*
87	γ -eudesmol	0.015	*	*
88	S-octahydrophenanthrene, 9-methyl-	0.014	*	*
89	δ -neoclovene	0.013	*	*
90	Benzene, 1-ethynyl-4-metoxy-	0.013	*	*
91	3-carene	0.013	*	*
92	Ciperene	0.012	*	*
93	Cubedol	0.012	*	*
94	β -nootkatone	0.011	*	*
95	Cembrene	0.011	*	*
96	Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-	0.011	*	*
97	1,4-benzenediol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.008	*	*
98	4-terpinenyl acetate	0.007	*	*
99	Verbenone	0.007	*	*
100	Phenylethyl Alcohol	0.006	*	*
101	Benzene, 1-methyl-2-propyl-	0.004	*	*
102	α -muurolene	0.003	*	*
103	Camphor	0.003	*	*
104	Caryophyllene-(I-1)	0.002	*	*
105	γ -selinene	0.002	*	*
106	Carveol	0.002	*	*
107	Guadiol	0.002	*	*
108	(+)-nerolidol	0.002	*	*

109	α -gurjunene	0.002	*	*
110	α -irone	0.002	*	*
111	β -eudesmol	0.002	*	*
112	cis 3-pinane	0.001	*	*
113	Terpinyl formate	0.001	*	*
114	Phenol acetate, 2,5-dimethyl-	0.0004	*	*
115	Durene	0.0003	*	*
116	Pinocarvone	0.0003	*	*

*Undetected compounds.

*Compuestos no detectados.

this study. In contrast, the compounds persin (17.9 %), 2 - [(8Z, 11Z) -heptadeca-8,11-dienyl] furan (15.8 %), squalene (13.9 %) and nonacosan (11.9 %) had higher concentrations, while, they were not identified in the present work. The difference in abundance may be due to the chemotype of the materials studied in each study (García-Rodríguez *et al.*, 2016).

In avocado materials, var. *drymifolia*, a high diversity of relative abundance was observed among the 27 individuals studied, mainly in the most abundant compounds. The ranges of abundance of the compounds estragole, karyophyllene, (+) - 4-carene and γ -terpinene were: 0.39 to 97.00 %, 0.56 to 71.50 %, 0.05 to 27.81 % and 0.60 to 28.63 %, respectively. In the «Hass» and «Mendez» varieties, only one individual from each variety was studied, so that it was not possible to determine the ranges of the concentrations, however, low variability was observed in these commercial varieties, probably because they are propagated in a clonal manner (García-Rodríguez *et al.*, 2016). On the other hand, in the «Hass» variety four secondary metabolites were identified, 1,3,4,5,6,7-hexahydro-2,5,5-trimethyl 2H-2,4a-ethanonaphthalene (0.84 %), α -cubebene (0.33 %), 2,4,6-octatrienoic acid (0.24 %) and α -felandrene (0.21 %), which were not detected in the *drymifolia* and «Mendez» variety (Table 1).

There are few reports related to defense activities of the MS. The estragole compound has antibacterial, antioxidant (Iskan, 2017), anticancer, genotoxic (Alhusainy *et al.*, 2012; Basaglia *et al.*, 2014) and callus inducer for *in vitro* plant regeneration (Ibrahim *et al.*, 2011). The karyophyllene compound has antibacterial and antifungal activity (Selestino-Neta *et al.*, 2017).

dienil] furan (15.8 %), escualeno (13.9 %) y nonacosano (11.9 %) presentaron concentraciones medias mayores, mientras que, no fueron identificados en el presente trabajo. La diferencia de abundancia puede deberse al quimitipo de los materiales estudiados en cada estudio (García-Rodríguez *et al.*, 2016).

En los materiales de aguacate var. *drymifolia*, se observó alta diversidad de abundancia relativa entre los 27 individuos estudiados, principalmente en los compuestos más abundantes. Los rangos de la abundancia de los compuestos estragol, cariofileno, (+)-4-careno y γ -terpineno fueron de 0.39 a 97.00 %, 0.56 a 71.50 %, 0.05 a 27.81 % y 0.60 a 28.63 %, respectivamente. En las variedades «Hass» y «Méndez», únicamente se estudiaron un individuo de cada uno, de tal manera, que no fue posible determinar los rangos de las concentraciones, no obstante, se estima baja variabilidad en estas variedades comerciales, debido a que, se propagan de manera clonal (García-Rodríguez *et al.*, 2016). Por otra parte, en la variedad «Hass» se identificaron cuatro metabolitos secundarios, 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H-2,4a-etanonaftaleno (0.84 %), α -cubebeno (0.33 %), 2,4,6-ácido octatrienoico (0.24 %) y α -felandreno (0.21 %), los cuales, no se detectaron en las variedades *drymifolia* y «Méndez» (Tabla 1).

Existen escasos reportes relacionados con actividades de defensa de los SM. El compuesto estragol tiene actividad antibacteriana, antioxidante (Iskan, 2017), anticancerígena, genotóxica (Alhusainy *et al.*, 2012; Basaglia *et al.*, 2014) e inductor de callo para la regeneración de plantas *in vitro* (Ibrahim *et al.*, 2011), mientras, el compuesto cariofileno tiene actividad antibacteriana y antifúngica (Selestino-Neta *et al.*, 2017). No hay reportes de las actividades de los compuestos careno y γ -terpineno.

There are no reports of biological activity for the compounds carene and γ -terpinen.

Also, in the avocado variety «Mendez,» the thymol compound was identified (0.06 %), which was not detected in *drymifolia* and «Hass» varieties (Table 1). The relative abundance of these compounds was less than 1 %. However, since it was not found in var. *drymifolia*, a susceptible variety to mistletoe attack, these SM and their combination, represent an opportunity to be studied in subsequent projects, to identify their possible relationship with tolerance to mistletoe.

The tolerance of avocado trees varieties «Hass» and «Mendez» to mistletoe attack could be explained by the presence of 1,3,4,5,6,7-hexahydro-2,5,5-trimethyl 2H-2,4a-ethanonaphthalene, α -cubebeno, 2,4,6-octatrienoic acid, α -felandrene and thymol or, the combination of several compounds, which are not found in *drymifolia* trees (Torres-Gurrola et al., 2011).

In avocado trees var. *drymifolia*, 80 compounds were identified, with concentrations in a range of 0.0003 to 1.335 % (Table 1), that were not detected in the trees of the «Hass» and «Mendez» varieties. The susceptibility or tolerance of avocado trees could depend not only on the biochemical profile of the individual but also on other complex factors such as the combination of compounds, physiological processes, the presence of diseases, nutritional deficiencies and the different stages of plant development.

Another particular group of 27 secondary metabolites, with relative concentrations of less than 2 %, were present in two or three of the varieties under study (Figure 1). These compounds can be of special attention because, 2,5-bis benzaldehyde and β -guaiene had 21.7X and 6.8X times more abundance, respectively in «Hass» vs. *drymifolia*. Additionally, 15 other compounds presented 0.2 to 4.3X times more abundance in «Hass» vs. *drymifolia* avocados (Table 2).

Similarly, the 2,5-bis benzaldehyde compound showed 19.7X times more abundance in avocado «Mendez» vs. *drymifolia*, and 23 other compounds presented 0.2 to 5.9X times more abundance in avocado «Mendez» vs. *drymifolia* (Table 2).

The difference in abundance of the 2,5-bis benzaldehyde compound between commercial varieties and var. *drymifolia*,

También, en el aguacate variedad «Méndez», se identificó el compuesto timol (0.06 %), el cual, no se detectó en árboles de las variedades *drymifolia* y «Hass» (Tabla 1). La abundancia relativa de estos compuestos fue menor al 1 %, no obstante, al no encontrarse en var. *drymifolia*, susceptible al ataque del muérdago, los metabolitos secundarios y su combinación, son una oportunidad de estudio en trabajos posteriores, para identificar la posible relación con la tolerancia.

La tolerancia de los árboles de aguacate variedades «Hass» y «Méndez» al ataque del muérdago podría explicarse por la presencia de los metabolitos secundarios 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H-2,4a-etanonaftaleno, α -cubebeno, 2,4,6-ácido octatrienoico, α -felandreno y timol o bien, la combinación de varios compuestos, los cuales no se encuentran en los árboles de la variedad *drymifolia* (Torres-Gurrola et al., 2011).

En los árboles de aguacate var. *drymifolia*, se identificaron 80 compuestos, con concentraciones relativas en un rango de 0.0003 a 1.335 % (Tabla 1), no detectados en los árboles de las variedades «Hass» y «Méndez». La susceptibilidad o tolerancia de los árboles de aguacate, podría depender no solo del perfil bioquímico del individuo sino también de otros factores complejos como la combinación de compuestos, procesos fisiológicos, la presencia de enfermedades, deficiencias nutrimentales y las diferentes etapas de vida de la planta.

Otro grupo particular de 27 metabolitos secundarios, con concentraciones relativas menores a 2 %, estuvieron presentes en dos o tres de las variedades en estudio (Figura 1). Estos compuestos pueden ser de especial atención porque, 2,5-bis benzaldehído y β -guaieno tuvieron 21.7 y 6.8X, respectivamente, veces más abundancia en «Hass» vs. *drymifolia*. Además, otros 15 compuestos presentaron de 0.2 a 4.3X veces más abundancia en aguacate «Hass» vs. *drymifolia* (Tabla 2).

De manera similar, el compuesto 2,5-bis benzaldehído presentó 19.7X veces más abundancia en aguacate «Méndez» vs. *drymifolia* y otros 23 compuestos presentaron de 0.2 a 5.9X veces más abundancia en aguacate «Méndez» vs. *drymifolia* (Tabla 2).

La diferencia de abundancia del compuesto 2,5-bis benzaldehído entre las variedades comerciales y var. *drymifolia* mencionada, sugiere la posibilidad de explorar más a detalle la relación de este metabolito secundario con la tolerancia al ataque del muérdago familia Loranthaceae.

Table 2.
Secondary metabolites in Hass and Méndez avocados with
higher concentration in relation to *drymifolia*.

Tabla 2.
Metabolitos secundarios en aguacates “Hass” y “Méndez” con
concentraciones más altas en comparación con aguacate *drymifolia*.

#	Secondary metabolites	H/d (X)	M/d (X)
1	Benzaldehyde, 2,5-bis	21.74	19.71
2	β -guaiene	6.77	5.29
3	β -copaene	4.35	*
4	β -phellandrene	3.90	1.84
5	Caryophyllene oxide	2.47	1.05
6	Naphthalene, 1-methyl-	2.45	*
7	Naphthalene, 2-methyl-	2.32	0.94
8	Methyl eugenol	2.29	5.90
9	o-cymene	1.58	0.68
10	2-carene	1.45	*
11	Naphthalene, 6-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-	1.26	0.69
12	α -terpinene	1.14	0.49
13	Copaene	1.09	0.89
14	α -copaene	0.96	0.62
15	Eucalyptol	0.68	0.36
16	β -cubebene	0.57	0.19
17	Anethole	0.19	0.18
18	($\pm$) cadinene	*	5.43
19	β -cadinene	*	2.18
20	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro- 1,6,8-trimethyl-	*	1.09
21	Methyl benzoic dodecyl ester, 2,6-difluoro-3-acido	*	0.67
22	(-)-aristolene	*	0.63
23	Isolongifolene	*	0.60
24	δ -selinene	*	0.53
25	α -elemene	*	0.47
26	Isodene	*	0.43
27	Humulene	*	0.30

X: Quantity of times more. H, Hass. d, *drymifolia*. M, Méndez.

X: Cantidad de veces más. H, Hass. d, *drymifolia*. M, Méndez.

suggests the possibility of exploring in more detail the role of this secondary metabolite regarding the tolerance to mistletoe attack from the Loranthaceae family.

There are no reports of these metabolites related to mistletoe tolerance, however, in the work on "Hass" avocado trees, reported by García-Rodríguez *et al.* (2016), they identified the MS α -cubebene (4.83 %) in higher relative abundance than in the present work (0.33 %). This compound presents antioxidant, antibacterial activity (Nivas & Gaikwad, 2014) and attracts beetles carrying pathogenic fungi for the plant (Kendra *et al.*, 2016). Besides, the α -felandrene and β -copaeno compounds (Table 2) have antimicrobial activity (De Santi *et al.*, 2017), β -guaieneo has antiseptic activity (Camacho-Romero *et al.*, 2017) and β -felandrene has antibacterial, antifungal and antioxidant properties (Gupta *et al.*, 2017; Fathy *et al.*, 2017). Concerning the compounds 2,5-bis

No hay reportes de estos metabolitos relacionados con tolerancia a muérdago, no obstante, en el trabajo en árboles de aguacate "Hass", reportado por García-Rodríguez *et al.* (2016), identificaron el SM α -cubebene (4.83 %) en mayor abundancia relativa que en el presente trabajo (0.33 %), el cual presenta actividad antioxidante, antibacterial (Nivas & Gaikwad, 2014) y atrae escarabajos portadores de hongos patógenos para la planta (Kendra *et al.*, 2016). Además, los compuestos α -felandrene y β -copaeno (Tabla 2) tienen actividad antimicrobiana (De Santi *et al.*, 2017), β -guaieneo tiene actividad antiséptica (Camacho-Romero *et al.*, 2017) y β -felandrene tiene propiedad antibacterial, antifúngico y antioxidante (Gupta *et al.*, 2017; Fathy *et al.*, 2017). En relación a los compuestos 2,5-bis benzaldehído, 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H-2,4a-etanonaftaleno, y 2,4,6-ácido octatrienoico no existen reportes de alguna actividad en plantas.

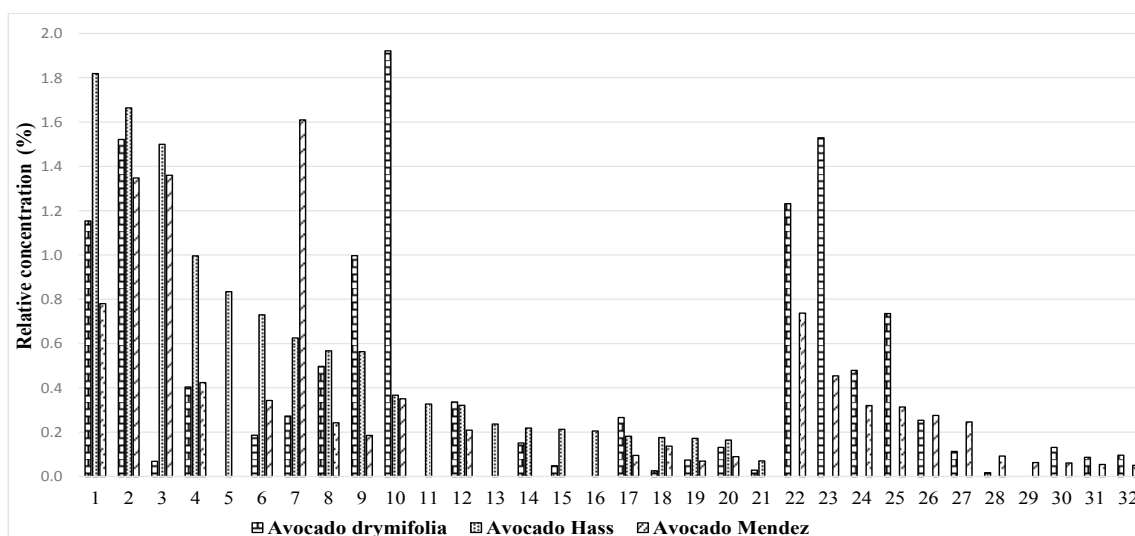


Figure 1. Relative abundance of secondary metabolites identified in the *drymifolia*, "Hass" and "Mendez" avocados. 1) o-cymene, 2) Copane, 3) 2,5-bis benzaldehyde, 4) Caryophyllene oxide, 5) 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H- 2,4a-Ethanonftaleno, 6) β -phellandrene, 7) Methyleugenol, 8) α -terpinene, 9) β -cubebene, 10) Anetole, 11) α -cubebene, 12) α -copaene, 13) 2,4,6-octatrienoic acid, 14) 2-carene, 15) β -copaene, 16) α -phellandrene, 17) Eucalyptol, 18) β -guaiene, 19) 2-methyl-naphthalene, 20) 6-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene, 21) 1-methyl-naphthalene, 22) Isolongifolene, 23) Humulene, 24) 2,6-Difluoro-3-methylbenzoic acid duodecyl ester, 25) Isoledene, 26) 1,2,3,4-tetrahydro-1,6,8-trimetil-naphthalene, 27) β -cadinene, 28) ($\pm$) cadinene, 29) Thymol, 30) α -elemene, 31) (-) - aristolene, 32) δ -selinene.

Figura 1. Concentración relativa de metabolitos secundarios identificados en aguacates *drymifolia*, Hass y Méndez. 1) o-cimeno, 2) Copano, 3) 2,5-bis benzaldehído, 4) Óxido de cariofileno, 5) 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H- 2,4a-Etanonaftaleno, 6) β -felandrene, 7) Metil eugenol, 8) α -terpineno, 9) β -cubebeno, 10) Anetol, 11) α -cubebeno, 12) α -copaeno, 13) 2,4,6-ácido octatrienoico, 14) 2-careno, 15) β -copaeno, 16) α -felandrene, 17) Eucaliptol, 18) β -guaieno, 19) 2-metil-naftaleno, 20) 6-etil-1,2,-3,4-tetrahidro-naftaleno, 21) 1-metil-naftaleno, 22) Isolongifoleno, 23) Humuleno, 24) 2,6-ácido difluoro-3-metilbenzoico ácido dodecil éster, 25) Isoledeno, 26) 1,2,3,4-tetrahidro-1,6,8-trimetil-naftaleno, 27) β -cadineno, 28) ($\pm$) cadineno, 29) Timol, 30) α -elemeno, 31) (-) - aristoleno, 32) δ -selineno.

benzaldehyde, 1,3,4,5,6,7-hexahydro-2,5,5-trimethyl 2H-2,4a-ethanonaphthalene, and 2,4,6-octatrienoic acid, there are no reports of any activity in plants.

It is important to note that most of the research done on avocado SM was carried out on different parts of the fruit, such as the seed, pulp and skin (Ikhuoria & Maliki, 2007; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011; Ceballos & Montoya, 2013; Dabas *et al.*, 2013; López-Cobo *et al.*, 2016; Figueroa *et al.*, 2018; Melgar *et al.*, 2018) and focused on activities related to human health (Yasir *et al.*, 2010).

Conclusions

In the volatile profile identified in the *drymifolia* avocado trees, "Hass" and "Mendez," the SM estragole, karyophyllene, (+) - 4-carene and γ -terpinene had the highest relative concentrations. However, being present in all three types of materials, these compounds were discarded as protective agents against mistletoe attack.

In trees of the *drymifolia* variety, a higher number of secondary metabolites was identified compared to the varieties "Hass" and "Mendez." This is the first report of a high number of secondary metabolites in the *drymifolia* material.

The secondary metabolites, 1,3,4,5,6,7-hexahydro-2,5,5-trimethyl 2H-2,4a-ethanonaphthalene, α -cubebene, 2,4,6-octatrienoic acid, and α -phelandrene are present in «Hass» avocado trees but not in *drymifolia* and "Mendez" varieties, while the thymol compound was identified only in the "Mendez" variety.

The 2,5-bis benzaldehyde compound was observed with higher relative abundance in avocado trees "Has" and "Mendez," 21.7 and 19.7X times respectively, compared to var. *drymifolia*. In order to determine the effect of these compounds present in "Hass" and "Mendez" exclusively, it is necessary to carry out isolation and characterization activities on the establishment and development of germination of mistletoe seeds under *in vitro* conditions.

This work is the first approach to the volatile profile in avocado leaves var. *drymifolia* (susceptible) and "Hass" and "Mendez" (tolerant) to the mistletoe attack (family Lauranthaceae) and can contribute to a better

Es importante señalar que la mayoría de los trabajos sobre los SM en aguacate, se llevaron a cabo en las partes del fruto, como la semilla, pulpa y cáscara (Ikhuoria & Maliki, 2007; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011; Ceballos & Montoya, 2013; Dabas *et al.*, 2013 ; López-Cobo *et al.*, 2016; Figueroa *et al.*, 2018; Melgar *et al.*, 2018) y con enfoque en actividades relacionadas con la salud humana (Yasir *et al.*, 2010).

Conclusiones

En el perfil volátil identificado en los árboles de aguacate *drymifolia*, "Hass" y "Méndez", los metabolitos secundarios estragol, cariofileno, (+)-4-careno y γ -terpineno presentaron las concentraciones relativas más altas. Sin embargo, al estar presentes en los tres tipos de materiales, estos compuestos fueron descartados como agentes protectores contra el ataque de muérdago.

En árboles de la variedad *drymifolia*, se identificó una mayor cantidad de metabolitos secundarios en comparación con las variedades "Hass" y "Méndez". Este es el primer reporte de un alto número de metabolitos secundarios en el material *drymifolia*.

Los metabolitos secundarios, 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil 2H-2,4a-etanonafthaleno, α -cubebeno, 2,4,6-ácido octatrienoico y α -felandreno se detectaron en árboles de aguacate "Hass" pero no en árboles de las variedades *drymifolia* y "Méndez", mientras el compuesto timol fue identificado solo en la variedad "Méndez".

El compuesto 2,5-bis benzaldehído se observó con abundancia relativa más alta en los árboles de aguacates "Hass" y "Méndez", 21.7 y 19.7X más, respectivamente, en comparación con la var. *drymifolia*. Para determinar el efecto de estos compuestos presentes en "Hass" y "Méndez" exclusivamente, es necesario que se realicen actividades de aislamiento y caracterización sobre el establecimiento y desarrollo de germinación de semillas de muérdago bajo condiciones *in vitro*.

Este trabajo es el primer acercamiento al perfil volátil en hojas de aguacate var. *drymifolia* susceptible y árboles de las variedades "Hass" y "Méndez" tolerantes al ataque del muérdago (familia Lauranthaceae) y puede contribuir al mejor entendimiento de los sistemas de

understanding of the defense systems of the crop against parasitic agents and optimize control strategies.

defensa del cultivo contra agentes parásitos y optimizar las estrategias de control.

References

- Ayala, T., and Ledesma, N. (2014). "Chapter 8. Avocado history, biodiversity and production," in Sustainable Horticultural Systems, Sustainable Development and Biodiversity, ed D. Nandwani (Springer International Publishing), 157–205. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06904-3_8
- Alhusainy, W., Berg, S. D., Paini, A., Campana, A., Asselman, M., Spenkelink, A. and Rietjens, I. M. (2012). Matrix modulation of the bioactivation of estragole by constituents of different alkenylbenzene-containing herbs and spices and physiologically based biokinetic modeling of possible in vivo effects. *Toxicological Sciences*, 129(1): 174–187. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs196>
- Azpeitia, F. & Lara, C. (2006). Reproductive biology and pollination of the parasitic plant *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) in Central México 1. *Journal of Torrey Botanical Society*, 133(3): 429–438. https://www.jstor.org/stable/20063856?seq=1#page_scan_tab_contents
- Basaglia, G., Fiori, J., Leoni, A. and Gotti, R. (2014). Determination of estragole in fennel herbal teas by HS-SPME and GC-MS. *Analytical Letters*, 47(2): 268–279. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.834444>
- Camacho-Romero, O. I., Melgarejo-Gómez, S. and De la Rosa-Torres, C. (2017). Extracción y evaluación de los metabolitos secundarios de extractos etéreos del fruto *Syzygium cumini* (Jambol). *Revista Tecnología En Marcha*, 30(1): 113–120. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v30n1/0379-3982-tem-30-01-00113.pdf>
- Ceballos, A. M. & Montoya, S. (2013). Chemical evaluation of fiber nib, pulp and three shell avocado varieties. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1): 103–112. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_artext&pid=S1692-35612013000100013
- Coria, V. M., Bello, M. A., Cortés, M., Guzmán, L. F., Muñoz, H. and Coria, R. G. (2015). Identificación de especies de muérdago asociadas al aguacate en Michoacán En: Plagas y enfermedades, Memorias del VIII Congreso Mundial de la Palta. 40 pp; Lima, Perú. http://www.avocadosource.com/WAC8/WAC8_TOC.htm [Last Choked: April 16th 2018].
- Crane J. H., Douhan G. W., Faber B. A., Arpaia, M. L., Bender, G. S., Balerdi, C. F. and Barrientos-Priego, A. F. (2013). Cultivars and Rootstocks. In: The Avocado: Botany, Production and Uses. Schaffer, Wolstenholme and Wiley, ed. 200–233 pp. Oxfordshire UK, Boston USA: CAB International.
- Dabas, D., Shogog, R., Ziegler, G. and Lambert, J. (2013). Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34): 6133–6140. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2013/00000019/00000034/art00007>
- De Santi, I. I., Gatto, D. A., Machado, M. R. G., dos Santos, P. S. B. and Freitag, R. A. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the oil and plant extract. *American Journal of Plant Sciences*, 8(7): 1560–1571. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.87108>
- Díaz-Limón, M. P., Cano-Santana, Z. and Queijeiro-Bolaños, M. E. (2016). Mistletoe infection in an urban forest in Mexico City. *Urban Forestry & Urban Greening*, 17: 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2016.04.004>
- Fathy, K., Dekinash, M., Beltagy, A., Moataz Bellah, E. and Khattab, A. (2017). Chemical composition and biological activity of essential oil from *Cotula cinerea* (Del.) growing wildly in the Middle East: A short review. *Int J Pharmacogn Chinese Med*, 1(1): 000103. https://www.researchgate.net/profile/Mohamed_Dekinash/publication/318520166_Chemical_Composition_and_Biological_Activity_of_Essential_Oil_from_Cotula_cinerea_Del_Growing_Wildly_in_the_Middle_East_A_Short_Review/links/596ebacda6fdcc2416901ba7/Chemical-Composition-and-Biological-Activity-of-Essential-Oil-from-Cotula-cinerea-Del-Growing-Wildly-in-the-Middle-East-A-Short-Review.pdf
- Ferrer-Pereira, H., Pérez Almeida, I. and Raymúndez Urrutia, M. (2017). Genetic characterization and diversity among avocado (*Persea americana* Mill.) genotypes from INIA-CENIAP, Venezuela. *Tree Genetics & Genomes*, 13(3): 56. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1128-x>
- Figueroa, J. G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J. and Segura-Carretero, A. (2018). Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass

- Q-TOF. *Food Chemistry*, 245: 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.011>
- García-Rodríguez, Y. M., Torres-Gurrola, G., Meléndez-González, C. and Espinosa-García, F. J. (2016). Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill. cv. "Hass". *Chemistry & Biodiversity*, 13(12): 1767–1775. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600169>
- Gupta, S., Bhagat, M., Sudan, R. and Bindu, K. (2017). Bioautography guided isolation and characterization of antimicrobial compounds of *Picea smithiana*. *JSM Biology*, 2(2): 1012-1017. https://www.researchgate.net/publication/318642046_Bioautography_Guided_Isolation_and_Characterization_of_Antimicrobial_Compounds_of_Picea_smithiana
- Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., Espíndola-Barquera, M. C. and Heredia-García, E. (2017). Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 8: 243. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00243>
- Ibrahim, A. K., Ahmed, S. A., Khattab, S. E. and El-Sherif, F. M. (2011). Efficient callus induction, plant regeneration and estragole estimation in tarragon (*Artemisia dracunculul* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 23(4): 16-20. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700463>
- Ikhuoria, E. & Maliki, M. (2007). Characterization of avocado pear (*Persea Americana*) and African pear (*Dacryodes edulis*) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6(7): 950-952. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56984>
- Iscan, G. (2017). Antibacterial and anticandidal activities of common essential oil constituents. *Records of Natural Products*, 11(4): 374-388. https://www.researchgate.net/publication/317318818_Antibacterial_and_Anticandidal_Activities_of_Common_Essential_Oil_Constituents
- Kendra, P., Montgomery, W., Deyrup, M. and Wakarchuk, D. (2016). Improved lure for redbay ambrosia beetle developed by enrichment of α -copaene content. *Journal of Pest Science*, 89(2): 427-438. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0708-5>
- Liu, K., Abdullah, A. A., Huang, M., Nishioka, T., Altaf-UI-Amin, M. and Kanaya, S. (2017). Novel approach to classify plants based on metabolite-content similarity. *BioMed Research International*, 2017: 5296729. <https://doi.org/10.1155/2017/5296729>
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Pasini, F., Caboni, M. F., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2016). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT - Food Science and Technology*, 73: 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.049>
- Medina-Carrillo, R. E., Salazar-García, S., Bonilla-Cárdenas, J. A., Herrera-González, J. A., Ibarra-Estrada, M. E. and Álvarez-Bravo, A. (2017). Secondary metabolites and lignin in "Hass" avocado fruit skin during fruit development in three producing regions. *HortScience*, 52(6): 852–858. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11882-17>
- Melgar, B., Días, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., García-Castello, E. M., Rodríguez-López, A. D., Barros, L. and Ferreira, I. (2018). Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 111: 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.024>
- Nivas, D. & Gaikwad, D. K. (2014). Phytochemical screening and in-vitro antioxidant activities of *Colubrina asiática* Brong. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 36: 282-288. https://www.researchgate.net/profile/Dr-Nivas-Desai/publication/267035758_Phytochemical_screening_and_in-vitro_antioxidant_activities_of_Colubrina_asiatica_Brong/links/549b99560cf2d6581ab2e5d8.pdf
- Peraza-Magallanes, A. Y., Pereyra-Camacho, M. A., Sandoval-Castro, E., Medina-Godoy, S., Valdez-Morales, M., Clegg, M. T., and Calderón-Vázquez, C. L. (2017). Exploring genetic variation, oil and α -tocopherol content in avocado (*Persea americana*) from northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(3): 443–449. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0478-9>
- Rincón-Hernández, C. A., Sánchez Pérez, J. D. and Espinosa-García, F. J. (2011). Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) de los bancos de germoplasma INIFAP-Michoacán. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(2): 19–49. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532011000200004&script=sci_arttext&lng=en
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P. and Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10): 5625–5635. <https://doi.org/10.1021/jf1048832>

- Selestino-Neta, M. C., Vittorazzi, C., Guimarães, A. C., Martins, J. L., Fronza, M., Endringer, D. C. and Scherer, R. (2017). Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time–kill curve studies. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 190–197. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1254251>
- Torres-Gurrola, G., Delgado-Lamas, G. and Espinosa-García, F. J. (2011). The foliar chemical profile of criollo avocado, *Persea americana* var. *drymifolia* (Lauraceae), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *Trioza anceps* (Trioziidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2):102–111. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.01.011>
- Tremocoldi, M. A., Rosalen, P. L., Franchin, M., Massarioli, A. P., Denny, C., Daiuto, É. R., Rizzato P. J.A., Siqueira M.P. and De Alencar, S. M. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PloS One*, 13(2): e0192577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192577>
- Watson, D. M. (2017). On tropical mistletoes: tractable models for evolutionary ecology, ecosystem function, and phytochemistry. *Botany*, 95(3): 211–217. <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0232>
- Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A. and Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382: 136–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>
- Yasir, M., Das, S. and Kharya, M. D. (2010). The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacognosy Reviews*, 4(7): 77–84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249906>