

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary Y VIRUS X DE LA
PAPA: INFECCIÓN MIXTA, DEFENSA DE LA PLANTA
Y EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS EN PAPA

T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

MA. GUADALUPE ALMANZA SERRANO

CHAPINGO, MÉXICO. MAYO DEL 2005

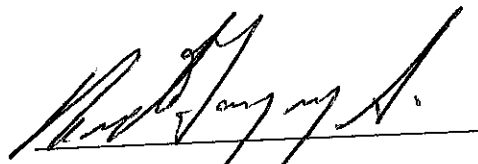


Phytophthora infestans (Mont.) de Bary Y VIRUS X DE LA PAPA: INFECCIÓN MIXTA, DEFENSA DE LA PLANTA Y EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS EN PAPA

Tesis realizada por Ma. Guadalupe Almanza Serrano, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR


Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR


Dra. María Teresa Colinas León

ASESOR


Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir y haber logrado una meta más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de la Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Departamento de Parasitología Agrícola (Personal y Académicos) por las facilidades brindadas durante mi estancia. A PICTIPAPA en México por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por su dedicación, consejos, enseñanza y aportaciones en la elaboración de esta tesis. A la Dra. María Teresa Colinas León y M.C. Ernestina Valadez Moctezuma por sus enseñanzas y aportaciones al presente trabajo.

Al personal del Laboratorio de Virus de Parasitología Agrícola Mario, y del Laboratorio de Usos Múltiples de Fitotecnia, Dr. Irán, Cecilio y Tacho por su apoyo en el presente trabajo.

A mis compañeros de la Maestría en Protección Vegetal y amigos de la Maestría en Horticultura.

A USDA APHIS IS, por el tiempo permitido para titularme.

DEDICATORIA

A mi esposo

José Luis Caballero Cárdenas,

por su amor, cariño y comprensión

A mi madre Guadalupe y padre Raúl,

A mis hermanos Lety, Adi, Rosy y Raúl

Alejandro,

por todo su cariño y amor.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis nació en Valle de Santiago, Guanajuato el 29 de mayo de 1975. En el mismo municipio realizó sus estudios de primaria en la Escuela Ausencia Alvarado y de Secundaria en Dr. Benjamín Lara y S. Ingresa a la Universidad Autónoma Chapingo, a propedéutico en la Unidad Regional de Zonas Áridas (URUZA) en 1994, de donde egresa en 1999 como Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia. En enero del 2002 ingresa a la Maestría en Protección Vegetal y egresa en diciembre del 2003. Ha trabajado en INEGI en Querétaro, producción y manejo de flores en invernadero, y actualmente trabaja para the United State Department of Agriculture (USDA APHIS IS).

CONTENIDO	Pags.
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN, ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Tizón tardío de la papa: <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary	4
2.1.1 Características.....	4
2.1.2 Síntomas.....	4
2.1.3 Ciclo de la enfermedad.....	4
2.2 Mecanismos bioquímicos de resistencia.....	5
2.2.1 Fenoles.....	6
2.2.2 Peroxidasas (POX).....	7
2.2.3 Fenilalanina amonio-liasa (FAL).....	7
2.3 Protección cruzada o inmunización.....	8
2.4 Función de la síntesis inducida de enzimas.....	9
2.5 Función de las enzimas que oxidan al fenol en la resistencia a las enfermedades.....	9
2.6 Fitoalexinas.....	10
2.6.1 Factores que inducen la producción de fitoalexinas en plantas.....	11
2.7 Modelo gen por gen.....	13
2.8. Penetración y establecimiento de la interface Hospedero-patógeno	13

2.8.1 Estrategias de reconocimiento.....	13
2.8.2 Penetración.....	14
2.8.3 Interface Hospedero-Patógeno.....	14
2.9 Modificaciones de la pared celular.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Ubicación del experimento.....	16
3.2 Material biológico y tratamientos.....	16
3.3 Fase de campo.....	16
3.4 Fase de laboratorio.....	17
3.4.1 Determinación de fenoles.....	18
3.4.2 Determinación de la actividad enzimática de POX.....	18
3.4.3 Determinación de la actividad enzimática de FAL.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1 Porcentaje de infección.....	20
4.2 Fenoles totales.....	23
4.3 Actividad de Peroxidasa (POX).....	28
4.4 Actividad de Fenilalanina-amonio-liasa (FAL).....	34
4.5 Análisis de correlación.....	41
5. CONCLUSIONES.....	45
6. LITERATURA CITADA.....	46
7. APÉNDICE.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Pags.

Cuadro 1. Comparaciones de medias para porcentaje de infección en cada uno de los tratamientos.....	21
Cuadro 2. Comparaciones de medias para concentración de fenoles totales en cada uno de los tratamientos.....	29
Cuadro 3. Comparaciones de medias para la actividad de POX en cada uno de los tratamientos.....	35
Cuadro 4. Comparaciones de medias para la actividad de FAL en cada uno de los tratamientos.....	37
Cuadro 5. Coeficiente de correlación entre las variables para la variedad Alfa en presencia de virus.....	42
Cuadro 6. Coeficiente de correlación entre las variables para la variedad Alfa en ausencia de virus.....	42
Cuadro 7. Coeficiente de correlación entre las variables para la variedad Zafiro en presencia de virus.....	43
Cuadro 8. Coeficiente de correlación entre las variables para la variedad Zafiro en ausencia de virus.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pags.
Figura 1. Porcentaje de infección para los tratamientos con y sin fungicida...	22
Figura 2. Concentración de fenoles totales para los tratamientos con y sin - fungicida.....	25
Figura 3. Concentración de fenoles totales para los tratamientos con y sin - virus.....	26
Figura 4. Concentración de fenoles totales para los tratamientos de la varie- dad Alfa y Zafiro.....	27
Figura 5. Actividad de la peroxidasa para los tratamientos con y sin fungi- cida.....	31
Figura 6. Actividad de la peroxidasa para los tratamientos con y sin virus...	32
Figura 7. Actividad de la peroxidasa para los tratamientos de la variedad - Alfa y Zafiro.....	33
Figura 8. Actividad de la FAL para los tratamientos con y sin fungicida.....	38
Figura 9. Actividad de la FAL para los tratamientos con y sin virus.....	39
Figura 10. Actividad de la FAL para los tratamientos de la variedad Alfa y Zafiro.....	40

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary Y VIRUS X DE LA PAPA: INFECCIÓN MIXTA, DEFENSA DE LA PLANTA Y EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS EN PAPA

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary AND POTATO VIRUS X: MIXED INFECTION, PLANT DEFENSE, AND DISEASE EXPRESSION IN POTATO

Ma. Guadalupe Almanza Serrano¹ y Héctor Lozoya Saldaña²

RESUMEN

Durante el verano 2003 se estudió la posible interacción de infección mixta con el oomiceto *Phytophthora infestans* (P.i.) y el Potexvirus X de la papa, en las variedades de papa Alfa, susceptible a P.i, y Zafiro, resistente, en poblaciones con o sin virus, y con o sin fungicidas, bajo condiciones naturales de infección por P.i en el Valle de Toluca México. La actividad de la peroxidasa en tratamientos con virus fue mayor en Alfa que en Zafiro, en las fases iniciales de desarrollo. Posteriormente se incrementó en Zafiro sin fungicidas y con virus. La actividad de la fenilalanina-amonioliasa (FAL) fue mínima y muy similar en plantas con o sin virus. La presencia de fenoles no fue indicativa ni discriminadora para identificar resistencia o susceptibilidad, y la resistencia genética de Zafiro al tizón tardío y el estímulo de defensa inducido por el virus se evidenciaron por la mayor actividad de la peroxidasa y de la FAL en individuos sin fungicida y con virus, que bajo cualquier otra combinación de tratamientos.

Palabras clave: Fenoles, PAL, peroxidasa, *Phytophthora infestans*.

ABSTRACT

In the summer of 2003, the possible interaction of a mixed infection composed of the *Phytophthora infestans* (P.i.) oomycete and the Potex Potato Virus X was studied in the Alpha potato variety, susceptible to P.i, and the Zafiro potato variety, resistant to P.i, in populations infected or not infected with this virus, with or without fungicides, under natural infection by P.i in the Toluca Valley, México. Peroxidase activity, was higher in Alpha, with or without the virus, than in Zafiro, in the early growing cycle. This activity increased later in Zafiro without fungicides and with the virus. The activity of phenylalanine-ammoniolase (PAL) was minimal and quite similar among plants with or without the virus. The presence of phenols was not indicative or discriminatory to identify resistance or susceptibility. The genetic resistance of Zafiro to late blight and the virus stimuli for defense were evidenced by the higher activity of peroxidase and PAL in virus infected individuals without fungicides than under any other treatment combination.

Key words: Phenols, PAL, peroxidase, *Phytophthora infestans*.

¹ Tesista, Posgrado en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México-Texcoco Km 38.5. Chapingo, Edo. de México. C.P. 56230.

² Profesor investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México-Texcoco Km 38.5. Chapingo, Edo. de México. C.P. 56230.

¹ Postgraduate student with the major of Plant Protection, author of the thesis. Autonomous University Chapingo, Carr. Mexico-Texcoco Km 38.5. Chapingo, State of Mexico, 56230.

² Research professor at the Department of Fitotecnia, Autonomous University Chapingo, Carr. Mexico-Texcoco Km 38.5. Chapingo, State of Mexico, 56230.

1. INTRODUCCIÓN

La interacción entre patógenos puede ser aditiva, sinérgica o antagónica. En el caso de los virus existe evidencia que indica que uno de sus efectos benéficos para la planta es su infección asintomática (Agrios, 2001). Esta infección sin síntomas trae como consecuencia que la planta se haga resistente a otros patógenos, lo cual es desorientador cuando se hacen evaluaciones de resistencia a hongos en plantas con virus, en donde no se sabe si los genotipos son realmente resistentes a los hongos o si dicha resistencia esta siendo conferida por la infección viral. Tal es el caso de la combinación de virosis y el tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) en papa (Müller y Munro, 1951).

La regulación metabólica de las interacciones hospedero-patógeno es un fenómeno que en los últimos tiempos se ha puesto en evidencia. Una de las vías metabólicas mas ampliamente empleadas hasta hoy para evitar las alteraciones metabólicas producidas por las enfermedades ha sido a través de los compuestos fenólicos. A estos compuestos se les han asignado diversas funciones en la regulación metabólica, y algunos autores han considerado su capacidad de inactivar enzimas segregadas por los hongos, así como su relación con la síntesis de fitoalexinas (Cornide *et al.*, 1994). En mecanismos de resistencia en plantas en interacciones hospedero-patógeno, se incluyen barreras de defensas físicas y químicas, también defensas provocadas por el invasor. Una respuesta de defensa es la síntesis de fitoalexina en el sitio de la infección. Las fitoalexinas han sido definidas como compuestos antimicrobiales de bajo peso molecular sintetizados y acumulados en plantas después de la exposición de la planta al microorganismo (Paxton, 1981).

La resistencia inducida ocurre cuando las plantas confieren resistencia a cierto tipo de patógeno dada por una previa infección viral o por varios tratamientos químicos (Goodman *et al.*, 1986); y este tipo de resistencia no es hereditaria. Normalmente cuando cierto tipo de patógenos es inhibido, es avirulento (Fraser, 1987). Hay plantas que son susceptibles a los patógenos pero pueden aparentar ser resistentes por las condiciones en que normalmente se desarrollan (Agrios, 2001).

Histórica y científicamente se acepta al Valle de Toluca como el lugar de origen del tizón tardío (Goodwin, 1996), por lo que en décadas recientes se le ha considerado como el lugar óptimo para seleccionar genotipos de papa resistentes al oomiceto. En el proceso, de varios años, los clones pueden infectarse por virus y se desconoce hasta que punto este hecho está interfiriendo con la correcta expresión genética de resistencia de la planta a *Phytophthora infestans*. El presente trabajo pretendió responder a esta interrogante.

1.1 Objetivos

1.1.1 Identificar reacciones de defensa de la planta de papa y relacionarlas con su resistencia genética al tizón tardío bajo condiciones naturales de infección

1.1.2 Cuantificar la presencia y/o acción de metabolitos de defensa de la planta, como respuesta a la presencia/ausencia de patógenos

1.1.3 Determinar el efecto de los fungicidas sobre la síntesis y actividad de fenoles, peroxidasa y fenilalanina-amonio-liasa en la relación hospedante-patógeno

1.2 Hipótesis

1.2.1 La infección viral confiere resistencia de la planta a *Phytophthora infestans* bajo condiciones naturales de infección.

1.2.2 Las plantas sanas son más susceptibles al tizón tardío que las infectadas con virus.

1.2.3 Aumenta la presencia y actividad de fenoles peroxidasa y de fenilalanina-amonio-liasa en las plantas expuestas a infecciones en relación directa a su resistencia genética contra enfermedades.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tizón tardío de la papa: *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.

2.1.1 Características: Fue descrito por De Bary en 1876 con base en las características de la fase asexual, micelio liso, hialino y muy ramificado, los esporangióforos ramificados en simpodio compuesto, con hinchamientos en las ramas; los esporangios, alimonados, alargados con papila inconspicua ($< 4 \mu\text{m}$); oospora aplerótica, anteridios anfígenos y especie heterotálica (Romero, 1988).

2.1.2 Síntomas: Las hojas de la papa presentan manchas pardas e irregulares y si las condiciones ambientales son húmedas, en los márgenes de la lesión en el envés de la hoja se observa un algodoncillo fino blanco grisáceo compuesto por esporangióforos y esporangios del hongo. A medida que la infección avanza, la mancha ennegrece. Varias manchas se unen para formar otras más grandes que cubren casi toda la hoja, la cual luego muere. Cuando los tallos son infectados, se pudren y mueren. El desarrollo de la enfermedad es más rápido cuando se presentan períodos frescos, lluviosos y húmedos en las mañanas, seguidos de períodos más cálidos (Mendoza, 1996).

2.1.3 Ciclo de la enfermedad: las condiciones favorables para el patógeno es ambiente húmedo y fresco. El hongo generalmente pasa el invierno en los residuos de la cosecha o en el suelo en forma de micelio u oosporas que al germinar invaden los brotes y ocasionan lesiones en el tallo y hojas donde produce esporangióforos que salen por los

estomas, los cuales después producen esporangios y estos a su vez liberan las zoosporas, que generan nuevas infecciones; también sobreviven en plantas abandonadas fuera de la temporada de cultivo (Mendoza, 1996). Los esporangios se forman a humedades relativas entre 91-100% y temperaturas de 3–26 °C, con un óptimo de 18-22 °C (Stevenson, 1991). Para la producción de las zoosporas se requieren temperaturas de 12 a 15 °C y éstas para penetrar al hospedante requieren una temperatura de 17 a 21 °C y esporula abundantemente con una humedad del 100% y temperatura de 16 a 22 °C. Para prosperar eficientemente la enfermedad requiere mínimo de 4 hrs en temperaturas abajo del punto de rocío y la temperatura nocturna no abajo de 10 °C, nublados y lluvias al día siguiente, con temperaturas de 15 °C hasta 26 °C durante el día, el esporangio germina mediante un tubo germinativo (Agrios, 2001).

2.2 Mecanismos bioquímicos de resistencia

Los mecanismos de resistencia pueden ser estructurales, fisiológicos y bioquímicos. Respecto al mecanismo bioquímico, el aspecto más estudiado es la producción de fitoalexinas. Las fitoalexinas son metabolitos secundarios antimicrobianos producidos por las plantas como respuesta a la infección, daños mecánicos o estrés (Costa *et al.*, 1974). Estas incluyen arriba de 300 productos naturales distribuidos la mayoría en fenoles, terpenoides, poliacetilenos, lípidos y derivados de ácidos y otras clases (Chet, 1993).

Müller (1958) propuso la presencia de sustancias defensivas como respuesta a infecciones fúngicas y demostró que en chícharo se produce un inhibidor contra infecciones fúngicas.

Frecuentemente se señala que la producción de fitoalexinas va ligada estrechamente con la resistencia de la planta a enfermedades fungosas (Baker *et al.*, 1988), sin embargo, para infecciones virales pocos intentos se han realizado para determinar si pueden afectar la replicación viral o restringir el daño local. Así, Klarman y Hammerschlag en 1972 determinaron que la incubación del VNT (virus necrosis del tabaco) en un extracto de hojas de soya conteniendo bajas concentraciones de gliceolina, no tuvo efecto sobre la infectividad viral; por otra parte estos autores sugieren que la presencia de fitoalexinas en las células que rodean las lesiones podrían, indirectamente, evitar la diseminación y la replicación viral.

De igual manera Bailey *et al.* (1976), sugieren la misma idea, en el sentido de que la acumulación de compuestos fenólicos en las células que rodean a la lesión causada por virus, provoquen una reacción de hipersensibilidad que limite la translocación del virus.

2.2.1 Fenoles

Los compuestos fenólicos y taninos existen en altas concentraciones en las células de las hojas o frutos jóvenes y se ha propuesto como el factor que determina la resistencia de los tejidos jóvenes a los microorganismos patógenos. Muchos de estos compuestos son potentes inhibidores de muchas enzimas hidrolíticas, incluyendo las pectolíticas, enzimas de la maceración de los fitopatógenos (Agrios, 2001). Los compuestos fenólicos se consideran inhibidores y confieren una protección general contra varios microorganismos, no solamente los fenoles presentan estas características pues las lactonas no saturadas confieren resistencia ante patógenos y las saponinas tienen actividad antifúngica. En estrecha relación con los compuestos fenólicos están las enzimas peroxidasas y las fenoloxidasas (Cornide *et al.*, 1994).

Legrand *et al.* en 1976, demostraron que la actividad de FAL, CA4H, OMT (catecol-O-metil transferasa) y peroxidasas, es incrementada en hojas de tabaco infectadas con VMT.

2.2.2 Peroxidasas (POX)

La peroxidasa también oxida fenoles o quinonas y ha sido asignada a una función propuesta para polifenoloxidasas en formación de lesiones. Una estimulación de actividad de esta enzima es la inoculación de hojas con virus, y ha sido observada la hipersensibilidad en todas las combinaciones virus- hospedero.

La actividad de la peroxidasa con frecuencia incrementa en respuesta a la infección, además la producción de cantidades antimicrobiales de peróxido de hidrógeno y la lignificación de más pared celular tradicional ayudan a que el hongo no penetre fácilmente (Rasmussen *et al.*, 1995).

En plantas infectadas, hay un incremento en una o más enzimas de defensa en el sitio de infección cuando el patógeno desarrollado esta siendo detectado (Stein *et al.*, 1993).

2.2.3 Fenilalanina amonio-liasa (FAL)

La ruta metabólica que mejor se conoce es la denominada metabolismo general de fenilpropanoides, que principia con la utilización del aminoácido fenilalanina, por la enzima fenilalanina amonio-liasa (FAL), hasta la producción de tioesteres de la coenzima A de derivados del ácido cinámico por la reacción de la enzima 4-cumarato ligasa (4CL) (Hahlbrock y Grisebach, 1975; Hahlbrock y Grisebach, 1979).

La fenilalanina amonio-liasa cataliza la eliminación de amonio y del pro-3s hidrógeno de la L-fenilalanina para formar el ácido *trans*-cinnámico, siendo reconocido este paso como el primero en la ruta de biosíntesis del esqueleto de los fenilpropanoides en plantas superiores (Jones, 1984), las cuales son modificadas dentro de una amplia variedad de compuestos fenólicos (Guiwen y Breen, 1991). La enzima es sensible a inhibición por su producto, *trans* cinnamato; su sitio activo esta formado por dos tetrámeros, el cual probablemente contiene un residuo de dehidroalanil. La localización subcelular de FAL es principalmente citoplasmática, además de que podría estar asociada con algunos organelos membranosos; cuando la enzima esta en varias formas, las diferencias en sus propiedades así como en sus productos metabólicos finales se han correlacionado con una localización subcelular diferente. Esta enzima es extraordinariamente sensible a los estados fisiológicos de la planta. La actividad puede sufrir cambios durante el crecimiento o por eventos traumáticos o patológicos (Jones, 1984).

2.3 Protección cruzada o inmunización

Desde 1929 Mckinney demostró que la infección con cepas avirulentas o benignas de virus, pueden proteger a las plantas contra variantes similares pero de mayor patogenicidad, este fenómeno se designó con el nombre de protección cruzada.

White y Antoniwi (1991) demostraron que la infección por Virus Mosaico del Tabaco (VMT) en tabaco genera la aparición de proteínas que inducen un mecanismo de resistencia a infecciones posteriores por otros patógenos, principalmente hongos.

2.4 Función de la síntesis inducida de enzimas

Una enzima que por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor en los tejidos enfermos, es la Fenilalanina amoniaco liasa (FAL), encontrada en células adyacentes a los sitios de la infección (Chet, 1993). Es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos fitoalexinas y la lignina. La resistencia de las plantas ante un patógeno va a depender de la velocidad y el grado de la síntesis de una o varias enzimas que inducen los patógenos u organismos similares no patogénicos sobre la planta (Agrios, 2001).

2.5 Función de las enzimas que oxidan al fenol en la resistencia a las enfermedades

La importancia de la actividad de la polifenoloxidasa (enzima que oxida al fenol) en la resistencia a las enfermedades probablemente se debe a su propiedad de oxidar los compuestos fenólicos hasta quinonas, las cuales con frecuencia son mucho más tóxicas a los microorganismos que los fenoles originales. Las oxidasas y peroxidasas no solo oxidan a los compuestos fenólicos, sino también aumentan la velocidad de polimerización de estos compuestos en sustancias similares a la lignina, que se deposita en las paredes y papilas celulares e interfieren con el posterior crecimiento y desarrollo del patógeno (Agrios, 2001).

Algunos estudios muestran que *P. infestans* reduce la producción de glicoalcaloides e induce la producción de fitoalexinas (Andreu *et al.*, 2001). La α -solanina y α -chaconina, son los principales esteroides glicoalcaloides en papa y han sido encontrados en la piel y alrededor de los sitios donde se produjo el daño en los tubérculos. Estos

también han sido encontrados en tubérculos y follaje sano, y sus concentraciones incrementan bajo condiciones de stress en tubérculos. La suberina contiene fenoles y en la superficie de los tejidos puede funcionar como una barrera física a la penetración microbial, al igual que la lignificación (Bailey y Mansfield, 1982). Dicha lignificación aparentemente ocurre en muchas plantas en respuesta a infecciones por hongos, bacterias y ocasionalmente virus. La suberina se ha asociado con resistencia en algunos casos. Los inhibidores de la FAL, ácido α -aminooxiacético y el ácido α -aminooxi- β -fenilpropionico, se han mostrado como inhibidores de la lignificación en tabaco infectado con virus (Callow, 1983).

2.6 Fitoalexinas

Las fitoalexinas tienen una masa relativamente pequeña, se producen en plantas en respuesta al ataque de patógenos o bajo la influencia de factores de estrés como las heladas o los rayos ultravioleta. En la planta no infectada y sin sufrir estrés, las fitoalexinas no se encuentran o están en cantidad mínima. Estos compuestos son también llamados sustancias antimicrobianas inducidas que están presentes en las plantas constantemente (Kuč y Currier, 1976). Como ejemplos pueden servir diferentes glucósidos de fenoles o lactonas, los cuales durante la invasión de los patógenos son hidrolizados por la β -glucosidasa liberando el aglicón, generalmente, muy tóxico para los microorganismos (Schonbeck y Schlosser, 1976).

Las fitoalexinas pertenecen a diversos grupos de compuestos químicos, sin embargo, en plantas que pertenecen a la misma familia éstas son generalmente similares. Por ejemplo las plantas Solanáceas producen fitoalexinas sesquiterpenoides (Kuč, 1995); en

el caso del frijol, cultivares resistentes y susceptibles a hongos patogénicos producen la faseolina, sin embargo las plantas resistentes producen este compuesto más rápidamente y en cantidades mayores que las plantas susceptibles (Jankiewicz y Sobiczewski, 2003).

2.6.1 Factores que inducen la producción de fitoalexinas en plantas.

Hasta ahora no se sabe plenamente como la infección por los patógenos o el estrés físico causan en la planta la producción de fitoalexinas; sin embargo, se sabe que en la inducción de su síntesis tienen un papel importante los “elicitores”, compuestos que se forman durante la infección. Se han descrito diferentes tipos de elicitores tanto de origen biológico como abiótico. Por ejemplo elicitores de origen biótico son carbohidratos provenientes de la pared celular destruida de las plantas o de la pared de los hongos, compuestos lipídicos, enzimas producidas por los microorganismos, polipéptidos, etc. Entre los elicitores de origen abiótico se encuentran las sales de metales pesados, los detergentes, etc. Los elicitores también se producen bajo la influencia de heladas o de la luz ultravioleta (Darvil y Albersheim, 1984). El oomiceto *Phytophthora infestans* segrega ácido araquidónico, un ácido graso normalmente no presente en plantas pero un constituyente mayor de lípidos de membrana de *Phytophthora infestans* que actúa como un elicitador en papa (Slusarenko *et al.*, 2001), y ácido 5,8,11,14,17-cis-eicosapentaénico. Estos ácidos son los elicitores de fitoalexinas del grupo de sesquiterpenoides (Szakiel, 1991).

Los elicitores de fitoalexinas se producen más frecuentemente como consecuencia de la infección causada por hongos y bacterias. Los pesticidas aplicados contra patógenos también pueden inducir la producción de fitoalexinas. Así el Metalaxyl usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* en soya liberaba de su micelio los elicitores de

gliceolina (Chasan, 1995). También la acción curativa de Fosetyl-Al fue correlacionada con el nivel de acumulación de la fitoalexina resveratrol en vid (Dercks y Creasy, 1989). Por el contrario aplicaciones de 2,4-D ha sido reportado como inhibidor de la actividad de la FAL en cultivos de tejidos (Dangyand y Mikal, 1986).

La formación de fitoalexinas depende de los factores del medio ambiente. Por ejemplo, la concentración máxima de cinco fitoalexinas en las hojas de algodón tratadas con extractos de *Aspegillus flavus*, ocurrió a la temperatura 30°/25°C (día/noche). La escasez de agua en estas hojas indujo la disminución de producción de fitoalexinas (Zeringue, 1990). Los factores físicos como las heladas influyen en la producción de fitoalexinas en forma indirecta ya que las células dañadas de la planta producen, en ellas mismas, las enzimas que separan fragmentos de la pared celular de las células dañadas y también sanas. Estos fragmentos sirven después como elicitores de fitoalexinas (Lyon y Albersheim, 1982). Un mecanismo semejante puede actuar en el caso de los daños por virus. La infección con el virus TMV induce en tabaco sustancias de molécula pequeña, las cuales causan la formación de las proteínas protectoras (PR) relacionadas con esta enfermedad (ingl. Pathogenesis related proteins, en abreviación: PR-proteins=proteínas PR). Estas proteínas se presentan también en la reacción de defensa contra otros patógenos como hongos, nemátodos y artrópodos (Gordon *et al*, 1991).

Algunas de las proteínas PR tales como la β -1,3-glucanasas (PR2) y quitinasas (PR3) son antifugicas in vitro y pueden también liberar elicitores de la pared celular del patógeno. La transformación de plantas con genes PR también ha dado un significado al rol de estas proteínas en resistencia. Por ejemplo, la expresión constitutiva de la PR1 en tabaco transgénico o la PR5 en papa transgénica incrementa la resistencia a patógenos

oomycetes (Cutt and Klessig, 1992; Yoshikawa *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994).

2.7 Modelo gen-por-gen

Las plantas pueden utilizar una gran cantidad de mecanismos bioquímicos para protegerse contra virus, bacterias, hongos y nemátodos. La respuesta por la planta a un patógeno potencial puede ser en tres fases: primero, el patógeno es reconocido por la planta, segundo, la señal apropiada es transmitida a la maquinaria transcripcional y traducional del hospedero, y tercero, la síntesis y/o liberación de las moléculas que impiden al patógeno crecer y desarrollarse. La hipótesis central específica en resistencia a enfermedades es el modelo gen por gen propuesto por Flor (1971), en éste modelo Flor propone que un gen único en el hospedero puede conferir resistencia a la planta si el patógeno contiene el gen complementario para avirulencia. Este es la presencia de un alelo dominante para resistencia en el hospedero y el complementario alelo dominante para avirulencia en el patógeno que da el resultado de la interacción (Buell, 2000).

2.8 Penetración y establecimiento de la interface hospedero-patógeno

2.8.1 Estrategias de reconocimiento

Los patógenos hongos y bacterias de la planta determinan los pasos cruciales donde los factores de resistencia estructural o mecanismos pueden interferir con el ingreso y crecimiento del patógeno. Cualquier patógeno potencial en la planta primero conocerá las ceras y la cutina de la cutícula como un obstáculo enfrente de los nutrientes dentro de las células de la planta (Slusarenko *et al.*, 2001).

2.8.2 Penetración

Una hifa típicamente fina y especializada, cerca de 1µm de diámetro comienza a penetrar o infectar. La penetración puede ocurrir directamente a través de la pared del periciclo, intercelular ó directamente por las aberturas naturales tales como los estomas (Hardham, 1992). La cutinasa, es frecuentemente inducida por productos de bajo peso molecular de su propia acción enzimática. El gen cutinasa de algunos hongos es producido constitutivamente. Estas empiezan a degradar la cutícula de la planta hospedera tan pronto como la espora del hongo ha caído en la superficie de una planta. Los monómeros de la cutina producidos son tomados por los hongos y fuertemente inducen el gen cutinasa. Mas cutinasa es producida para que el hongo pueda eventualmente degradar y penetrar la cutícula de la planta (Podila *et al.*, 1988).

2.8.3 Interface Hospedante-Patógeno

Los hongos biotróficos deben establecer una interface funcional con la planta viva, es decir, el hongo debe entrar a la pared celular y hacer contacto con la membrana plasmática de las células del hospedero. Una vez que hace contacto con la membrana desarrolla una hifa especializada o haustorio, estas estructuras especializadas se reproducen rápidamente y el hongo se mueve de una célula a otra durante la colonización de los tejidos del hospedero (Hardham, 1992).

2.9 Modificaciones de la pared celular

La primera barrera que los patógenos encuentran es la pared celular, una estructura que los patógenos son capaces de atravesar sin dificultad. Sin embargo, las células de la planta pueden responder rápidamente a la infección modificando las paredes celulares de

manera que las paredes llegan hacer una barrera más efectiva al ingreso de patógenos en los tejidos (Ride, 1978).

La lignificación y la deposición de compuestos fenólicos similares es un tipo de modificación en la pared celular que ha sido relacionado con resistencia (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Durante las primeras etapas de infección en una planta resistente, la célula hospedera en contacto con el patógeno con frecuencia deposita lignina o algún tipo de materiales fenólicos en la pared celular en el punto de invasión del hongo. Estos depósitos de lignina son altamente localizados y aparecen en bloques de la hifa (Stein *et al.*, 1993). Si la penetración ocurre después de la penetración a la pared celular, la célula entera puede lignificar (Hammerschmidt *et al.*, 1985) por consiguiente potencialmente atrapa al patógeno en una cámara lignificada. Otra forma que puede ayudar en resistencia es por lignificación de la pared celular del patógeno. Esto ha sido observado en tejido de hoja de pepino. Así, la lignificación puede funcionar conteniendo el patógeno en un lugar hasta que son inducidas otras defensas (Stein *et al.*, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

La presente investigación constó de dos fases: la fase de campo y la fase de laboratorio. La fase de campo se llevó a cabo en los campos experimentales de PICTIPAPA (Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa) en Metepec, Estado de México; en donde se presentan las condiciones climatológicas favorables al tizón tardío, ocasionando un severo ataque cuando el periodo de humedad relativa es superior al 90% de 8 ó 10 hrs en varios días consecutivos y la temperatura fluctúa entre 10 y 24°C (Henfling, 1987). La fase de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia y en el Laboratorio de Virología en el Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2 Material biológico y tratamientos

Se usaron las variedades Alfa y Zafiro, susceptible y medianamente resistente a *Phytophthora infestans* respectivamente. De cada una de ellas hubo una población con virus con fungicida, sin virus con fungicida, con virus sin fungicida y sin virus sin fungicida como testigo, obteniendo un total de 8 tratamientos y 4 repeticiones.

3.3 Fase de Campo

Se sembró el día 20 de junio del 2003 en condiciones de temporal, aproximadamente 60 tubérculos por tratamiento, al momento de la siembra se aplicó a la semilla (tubérculo) Benlate (1 kg i.a. ha⁻¹), Captan (1 kg i.a. ha⁻¹) e Imidacloprid (350 g i.a. ha⁻¹), contra patógenos del suelo.

El programa que se uso para este trabajo fue el siguiente: Se realizaron dos fertilizaciones; una antes de la siembra con la fórmula 120-180-120 más 20 kg de Ca y 10 kg de Mg por hectárea. La segunda fertilización se hizo a los 53 dds con 60 kg de N ha^{-1} al momento de la escarda. Se aplicó un herbicida preemergente Sencor a una dosis de 850 ml ha^{-1} . Se realizaron aplicaciones semanales de insecticidas y fungicidas en rotación. Los insecticidas fueron Folidol (1 lt. ha^{-1}), Metasytox (1 lt. ha^{-1}), Thiodan (1.5 lt. ha^{-1}), Tamaron (1 lt ha^{-1}) y Folimat (600 ml. ha^{-1}); y los fungicidas Acrobat (2.5 kg ha^{-1}), Ridomil Gold (2.5 kg ha^{-1}), Curzate (2 kg ha^{-1}), Manzate (3 kg ha^{-1}), Mancozoxil 72 (2.5 kg ha^{-1}), Raksha (3 kg ha^{-1}) y Bravo 720 (2 lt ha^{-1}). La quema de follaje se hizo a los 121 dds, y se cosecho a los 140 dds.

A partir de un mes después de la siembra en campo se hicieron lecturas semanales (8 lecturas), de acuerdo a la escala de Henfling (1987) Apéndice 1. Además se recolectaron muestras de follaje (15 g) de cada tratamiento y sus repeticiones (32 muestras) semanalmente.

3.4 Fase de Laboratorio

Antes de la siembra se analizaron los tubérculos de papa de cada variedad para la detección de virus mediante la técnica serológica ELISA, esto para asegurarnos de que la semilla estuviese libre de virus y la que salió positiva fue destinada a los tratamientos con virus.

Para la determinación de la actividad enzimática primero se preparó polvo de acetona. A partir de 15 g de folíolos de papa + 50 ml de acetona al 100% a 4°C, se molieron en la licuadora, filtradas al vacío recuperando el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces con el mismo tejido, y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se

etiquetó y guardó en refrigeración (4°C) hasta el ensayo de las enzimas FAL y POX (Alia-Tejacal *et al.*, 2002). El sobrenadante se utilizó para la determinación de fenoles totales de acuerdo al método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994).

3.4.1 Determinación de fenoles

Se usaron 0.03 ml del sobrenadante + 16.97 ml de agua desionizada + 1 ml de Folin-Ciocalteu + 2 ml de carbonato de sodio al 20%. Se agitó y se dejó reposar por 2 hr en la oscuridad para posteriormente leer la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D (Milton Roy). La cuantificación se realizó mediante una curva patrón de ácido tánico y la concentración de fenoles totales se registró como mg g^{-1} p f.

3.4.2 Determinación de la actividad enzimática de POX

La determinación de la POX se determinó mediante la metodología descrita por Alia-Tejacal *et al.*, (2002) con algunas modificaciones. La enzima se extrajo a partir de 0.1g de polvo de acetona con 5 ml de Tris-HCl frío (pH 7.1) conteniendo 1% de polivinilpirrolidona. Se mezclaron en un homogenizador de tejidos durante 50 segundos, posteriormente la mezcla se centrifugó por 20 min a 12,500 rpm a 4°C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo de acuerdo con Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: la mezcla de ensayo fue con un volumen total de 3 ml, 2.6 ml de amortiguador Tris-HCl (pH 7.1.), 0.25 ml de guayacol 0.1 M, 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 0.25% y 0.05 ml del sobrenadante. Se evaluó el cambio de absorbancia a los 30, 60, 120 y 180 segundos a 470 nm. La actividad enzimática se reporta como U g^{-1} p f donde U = Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol min^{-1} de tetraguayacol.

3.4.3 Determinación de la actividad enzimática de FAL

La FAL se extrajo con el método descrito por Martínez-Tellez y Lafuente (1997), a partir de 0.1 g de polvo de acetona con 5 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8) frío + 20 mM B-mercaptoetanol, y se homogenizó por 50 segundos. Enseguida se agitó la mezcla durante 20 min en baño con hielo (4°C), posteriormente se filtró usando embudo de plástico y malla de tela y se centrifugó a 12000 Xg a 4°C durante 20 min. Se extrajo el sobrenadante, la enzima se precipitó agregando 0.46 g de sulfato de amonio por cada mililitro de sobrenadante y se agitó durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 12000 Xg a 4°C. Se utilizó el precipitado y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se redisolvió agregando 5 ml de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8), siendo éste último extracto el que se usó para el ensayo. El ensayo enzimático se realizó de acuerdo con Arz y Grambow (1995) con algunas modificaciones; la mezcla para el ensayo consistió de 1.8 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8), 0.9 ml del extracto final, preincubado a 40 °C por 5 minutos. Posteriormente se agregó 0.3 ml de L-fenilalanina 100 mM y se midió la absorbancia a 290 nm. Simultáneamente se llevó a cabo el ensayo de una repetición de la muestra con 2.1 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8) y 0.9 ml del extracto final. Se evaluó el cambio de absorbancia en 2 h a 290 nm a luz ultravioleta, manteniendo la muestra en baño maría a 40°C. La actividad enzimática se reporta como $U\ g^{-1}\ p\ f$ donde U = incremento (absorbancia) a 290 nm/h.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Porcentaje de infección

Durante el desarrollo del cultivo se presentaron condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo del patógeno *Phytophthora infestans* (*P. i.*), es decir una humedad relativa de 75-95% y una temperatura alrededor de los 15 °C (Apéndice 2), períodos frescos, lluviosos y húmedos en las mañanas, seguidos de períodos más cálidos lo que tuvo como consecuencia un desarrollo más rápido de la enfermedad de acuerdo a las condiciones descritas por Mendoza (1996) y Henfling (1987); esto ocasionó un fuerte ataque a la variedad alfa que es susceptible a *P. i.*, en especial sin fungicida, que a partir del cuarto muestreo se perdieron estos tratamientos alcanzando las plantas un 100 % de infección y la variedad Zafiro se comportó medianamente resistente (Figura 1). Las variedades sin fungicida resultaron con el más alto porcentaje de infección, oscilando alrededor del 90.75 % de follaje dañado para la variedad Zafiro sin virus, 91.25 % para Zafiro con virus, en la última semana de evaluación, y el 100 % para la variedad alfa con virus y sin virus a partir del cuarto muestreo, presentando diferencias estadísticas entre ellas. Las variedades Alfa y Zafiro con fungicida obtuvieron valores semejantes en porcentaje de infección a la última semana del muestreo y fue de 40% para las Alfas con virus y sin virus y de 41.25 % para Zafiro con virus y 40 % para Zafiro sin virus, sin presentar diferencias estadísticas entre ellas (Cuadro 1). Los tratamientos con virus mantuvieron el porcentaje de infección por debajo de los tratamientos sin virus aunque fue poca la diferencia entre ellos, coincidiendo con Goodman *et al.*, (1986) quienes señalan que la resistencia inducida ocurre cuando las plantas confieren resistencia a cierto tipo de patógeno dada por una previa infección viral; y en el caso de VMT en tabaco genera la

Cuadro 1. Comparaciones de medias para porcentaje de infección en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8	
	Media		Media		Media		Media		Media		Media		Media		Media	
Alfa CV/CF	12.50	DE	20.00	E	28.25	C	31.25	D	37.50	CD	38.25	C	40.00	C	40.00	C
Alfa SV/CF	20.00	C	32.50	C	39.00	B	40.00	C	40.00	C	40.00	C	40.00	C	40.00	C
Alfa CV/SF	31.25	B	65.00	B	92.50	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
Alfa SV/SF	47.50	A	81.20	A	92.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
Zafiro CV/CF	9.50	E	13.70	F	17.50	D	26.25	D	32.50	DE	32.50	D	35.00	D	41.25	C
Zafiro SV/CF	16.25	CDE	20.00	E	20.00	D	30.00	D	30.00	E	35.00	CD	40.00	C	40.00	C
Zafiro CV/SF	12.50	DE	25.00	DE	37.50	B	55.00	B	65.00	B	71.25	B	83.75	B	91.25	B
Zafiro SV/SF	17.50	CD	30.00	CD	43.75	B	60.00	B	67.50	B	72.50	B	80.00	B	90.75	B

Medias con letras iguales dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey $\alpha=0.05$.

CV: con virus; SV: sin virus; CF: con fungicida; SF: sin fungicida.

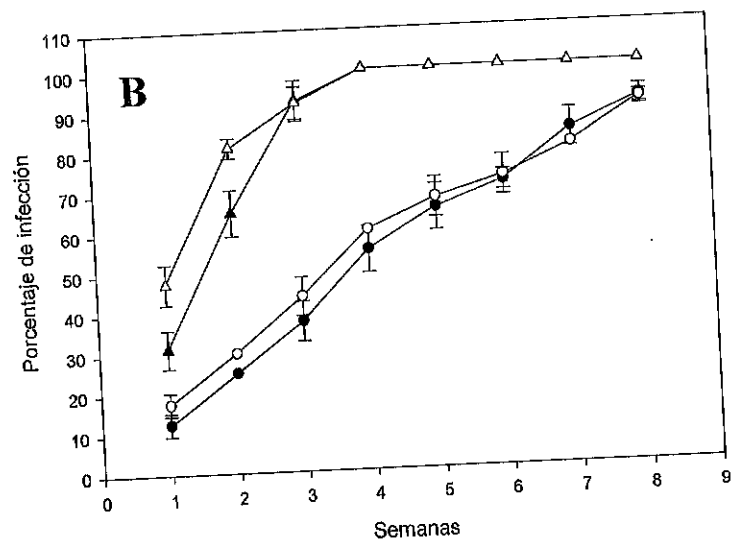
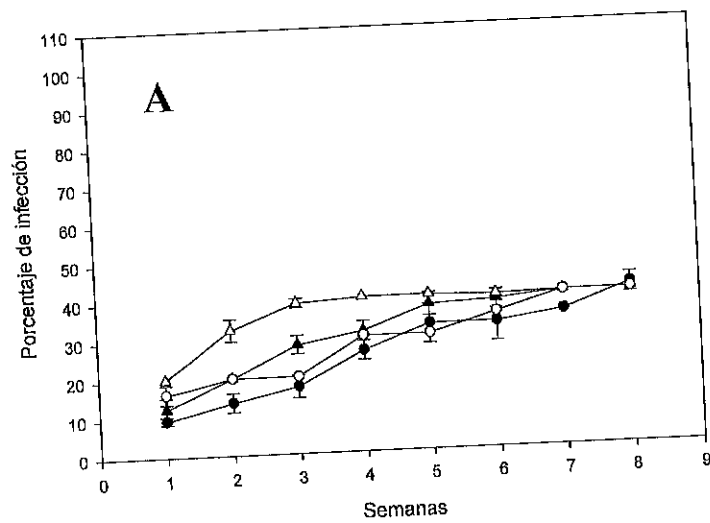


Figura 1. Porcentaje de infección para los tratamientos Alfa con virus ▲; Alfa sin virus △; Zafiro con virus ●; Zafiro sin virus ○; con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

aparición de proteínas que inducen un mecanismo de resistencia a infecciones posteriores por patógenos (White y Antoniow, 1991). Alfa con virus en el séptimo muestreo alcanzó el porcentaje más alto de infección, mientras que Alfa sin virus lo alcanzó en el cuarto muestreo y se mantuvo así hasta el octavo muestreo (Figura 1). Independientemente de con y sin fungicidas las plantas virosas retrasaron la infección inicial por tizón o la disminuyó en las fases iniciales de desarrollo, por lo que se comprueba la hipótesis de que las plantas sanas son más susceptibles al tizón que las virosas.

4.2 Fenoles totales

El contenido de fenoles con y sin fungicida registró un aumento de acuerdo al progreso de la infección (Figura 2). De acuerdo con Agrios (2001), los fenoles son de gran importancia y se pueden acumular como fitoalexinas, como el resultado del ataque de microorganismos contribuyendo a la resistencia a enfermedades. En los tratamientos con y sin fungicida en la modalidad con virus obtuvieron las concentraciones más altas respecto a los tratamientos sin virus, durante el período de evaluación; para el primer muestreo la concentración en Alfa con virus fue de 1.0688 mg g^{-1} de p f; la concentración más baja fue para Zafiro sin virus con 0.3721 mg g^{-1} de p f, presentando diferencias estadísticas entre ellas. En los tratamientos sin fungicida sucedió lo mismo, Alfa con virus presentó la concentración más alta en el primer muestreo con 0.5470 mg g^{-1} de p f; la concentración más baja fue para Zafiro sin virus con 0.3296 mg g^{-1} de p f, presentando diferencias significativas entre ellas. Todos los tratamientos tuvieron un comportamiento lineal alcanzando el máximo valor en el sexto muestreo. En el séptimo muestreo descienden para después subir ligeramente en el octavo muestreo. La máxima

concentración en el sexto muestreo fue para Alfa sin virus con fungicida, con 0.9273 mg g^{-1} de p f. En el último muestreo los tratamientos con virus tuvieron los valores más altos en concentración de fenoles, excepto Zafiro con virus con fungicida, que fue superado por Zafiro sin virus sin fungicida (Figura 2). De acuerdo con Goodman *et al.* (1986), las plantas confieren resistencia a cierto tipo de patógeno dada por una previa infección viral o por varios tratamientos químicos; y McKinney (1929) demostró que la infección con cepas avirulentas o benignas de virus, pueden proteger a las plantas contra variantes similares pero de mayor patogenicidad. Este fenómeno se designó con el nombre de protección cruzada. Además White y Antoniow (1991) demostraron que la infección por VMT en tabaco provoca la aparición de proteínas que inducen un mecanismo de resistencia a infecciones posteriores por otros patógenos, principalmente hongos. Una infección con el virus VMT induce en tabaco sustancias de molécula pequeña, las cuales causan la formación de las proteínas protectoras PR relacionadas con esta enfermedad (ingl. Pathogenesis related proteins, en abreviación: PR-proteins=proteínas PR). Estas proteínas se presentan también en la reacción de defensa contra otros patógenos como hongos, nemátodos y artrópodos (Gordon *et al.*, 1991).

En general la concentración de fenoles en los tratamientos con fungicida fueron mayores en relación con los tratamientos sin fungicida, excepto en el tercer muestreo donde Alfa sin virus sin fungicida con 0.6270 mg g^{-1} de p f, superó a Alfa con virus con fungicida y los tratamientos de Zafiro sin fungicida superaron a los tratamientos de Zafiro con fungicida; en el quinto muestreo sucedió lo mismo Zafiro con virus sin fungicida con 0.6293 mg g^{-1} de p f, superó a Zafiro sin virus con fungicida. Durante todo el periodo de muestreo con fungicida Alfa tuvo los más altos valores de concentración de fenoles (Figura 3). Este efecto puede ser atribuido a una mayor respuesta en la síntesis de

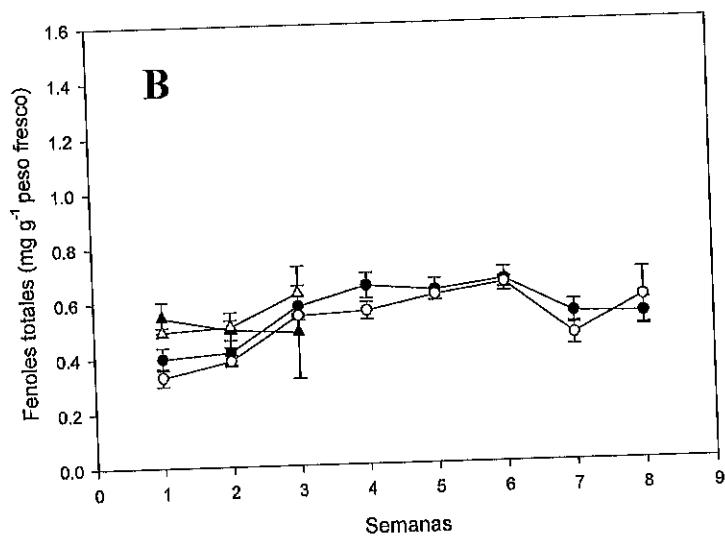
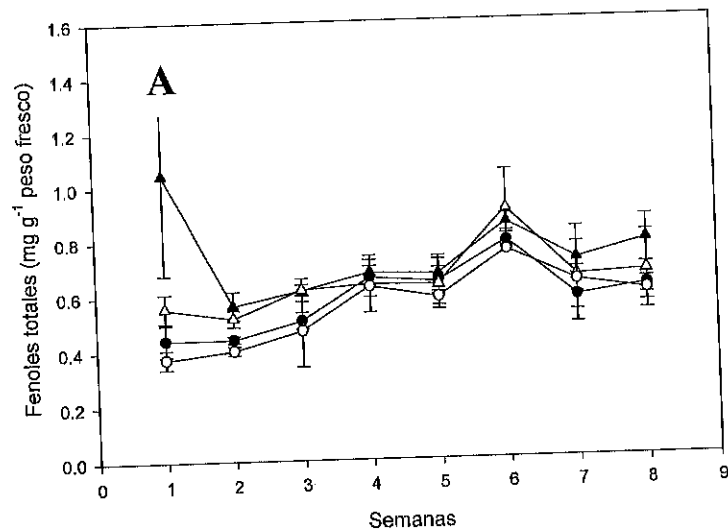


Figura 2. Concentración de Fenoles totales para los tratamientos de Alfa con virus ▲; Alfa sin virus Δ; Zafiro con virus ●; Zafiro sin virus ○; con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

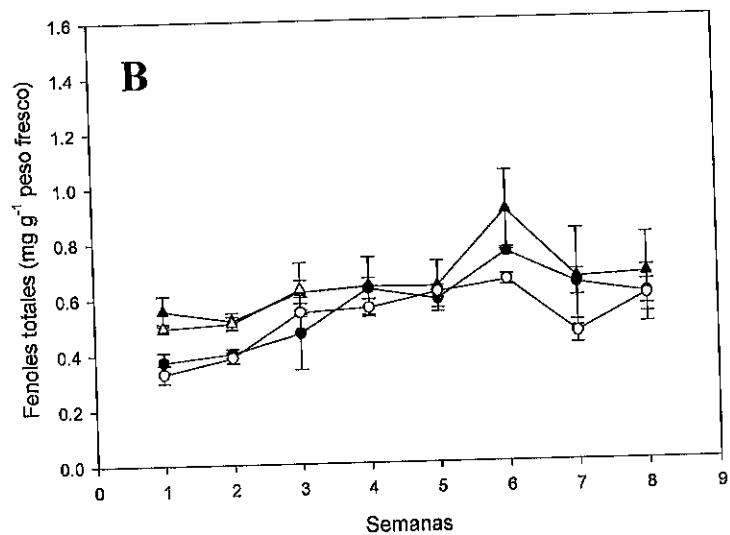
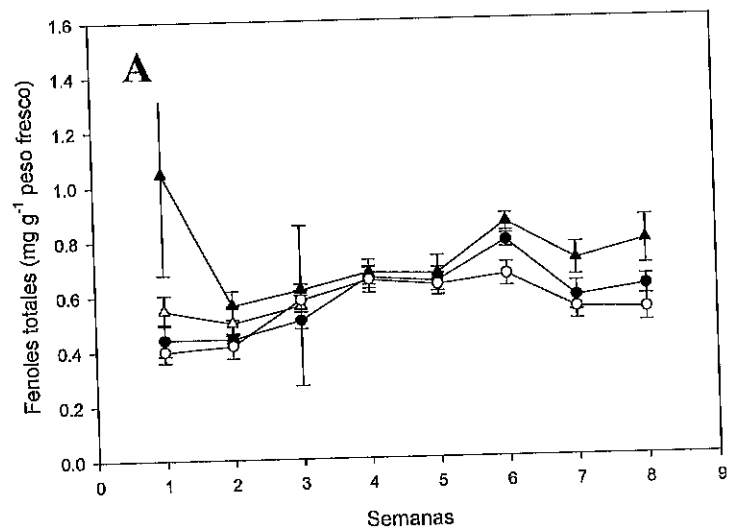


Figura 3. Concentración de Fenoles totales para los tratamientos de Alfa con fungicida ▲; Alfa sin fungicida Δ; Zafiro con fungicida ●; Zafiro sin fungicida ○; con (A) y sin (B) virus. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

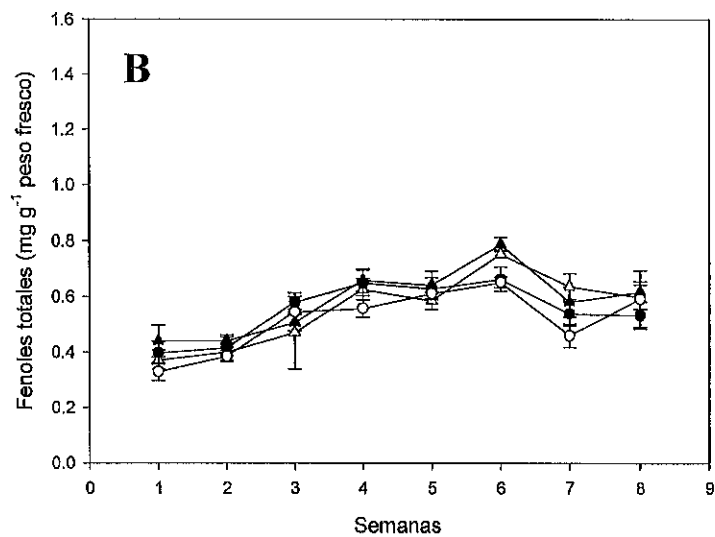
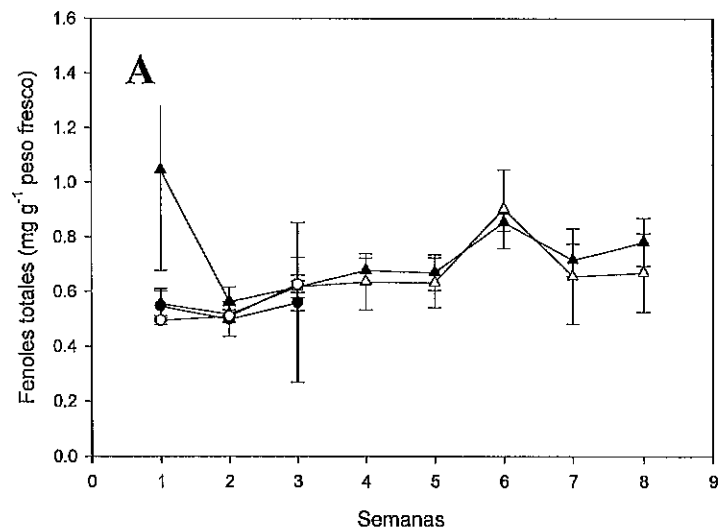


Figura 4. Concentración de Fenoles totales para los tratamientos con virus con fungicida ▲; sin virus con fungicida △; con virus sin fungicida ●, sin virus sin fungicida ○; en la variedad Alfa (A) y Zafiro (B). Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

fitoalexinas y por lo tanto un aumento en la concentración de fenoles. Existen algunos reportes donde la síntesis de fitoalexinas fue correlacionada con la aplicación de fungicidas como el Metalaxyl usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* en soya (Chasan, 1995). También la acción curativa de Fosetyl-Al fue correlacionada con el nivel de acumulación de la fitoalexina resveratrol en vid (Dercks y Creasy, 1989). En los tratamientos con y sin fungicida la variedad Alfa se mantuvo ligeramente con las concentraciones más altas respecto a la variedad Zafiro a lo largo del periodo de muestreo y el tratamiento con la más alta concentración de fenoles para la variedad Alfa y Zafiro fue con virus con fungicida (Figura 4), presentando diferencias significativas (Cuadro 2). Estos resultados son contrarios a lo reportado por Patil *et al.*, (1985) y Velazhahan y Vidhyasekaran (1994), que dicen que la acumulación de compuestos fenólicos durante la infección por patógenos ha sido reportada como alta en plantas resistentes y baja en plantas susceptibles.

4.3 Actividad de Peroxidasa (POX)

Los tratamientos con fungicida presentaron altibajos en el contenido o actividad de esta enzima a lo largo del periodo de muestreo, en el primer muestreo el tratamiento con alta actividad fue Alfa sin virus ($10256.4 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$) y el tratamiento Alfa con virus presentó baja actividad con $6294.8 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$, mostrando diferencias estadísticas entre ellas. En el cuarto muestreo todos los tratamientos con fungicida bajan la actividad de peroxidasa, y no presentan diferencias estadísticas entre ellas (Cuadro 3). A partir del quinto muestreo aumentan la actividad teniendo un comportamiento lineal, y después del séptimo muestreo baja la actividad, y en el octavo muestreo alcanza alta actividad Zafiro con virus con $6628.4 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$ y baja actividad el tratamiento Alfa con virus con 2958.9 U g^{-1}

Cuadro 2. Comparaciones de medias para la concentración de fenoles totales en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8	
	Media		Media		Media		Media		Media		Media		Media		Media	
Alfa CV/CF	1.068 A		0.563 A		0.617 A		0.677 A		0.669 A		0.853 AB		0.715 A		0.781 A	
Alfa SV/CF	0.555 B		0.555 A		0.618 A		0.642 AB		0.635 A		0.927 A		0.693 AB		0.694 AB	
Alfa CV/SF	0.547 BC		0.499 AB		0.493 AB		0.000 C		0.000 B		0.000 F		0.000 E		0.000 D	
Alfa SV/SF	0.494 BCD		0.509 AB		0.627 A		0.000 C		0.000 B		0.000 F		0.000 E		0.000 D	
Zafiro CV/CF	0.439 BCD		0.441 BC		0.506 AB		0.659 AB		0.642 A		0.786 BC		0.580 BCD		0.618 BC	
Zafiro SV/CF	0.372 CD		0.401 C		0.470 B		0.626 AB		0.585 A		0.752 CD		0.637 ABC		0.598 BC	
Zafiro CV/SF	0.397 BCD		0.416 BC		0.579 AB		0.649 AB		0.629 A		0.658 DE		0.539 CD		0.533 C	
Zafiro SV/SF	0.329 D		0.385 C		0.545 AB		0.558 B		0.611 A		0.651 E		0.460 D		0.592 BC	

Medias con letras iguales dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey $\alpha=0.05$.

CV: con virus; SV: sin virus; CF: con fungicida; SF: sin fungicida.

p f, presentando diferencias significativas entre ellas, la alta actividad de Alfa se atribuye a una mayor cantidad de sustrato como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Robinson, 1991), el cual se produce durante la respiración, que pudiera aumentar debido al estrés causado por la infección del hongo. Para los tratamientos sin fungicidas el comportamiento fue lineal a lo largo del crecimiento del cultivo, en el primer muestreo los tratamiento sin virus fueron más altos en relación con los tratamientos con virus, no presentando diferencias estadísticas dentro de los tratamientos de la misma variedad. A partir del segundo muestreo, los tratamientos con virus superan a los tratamientos sin virus y en la variedad Zafiro con virus se mantiene este comportamiento, teniendo el máximo valor en el séptimo muestreo con $15312.8 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$, y Zafiro sin virus alcanzó $11505.5 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$, presentando diferencias significativas entre ellas (Figura 5).

Para los tratamientos dentro del grupo con virus (Figura 6), en la modalidad sin fungicida alcanzaron los valores más altos en actividad de peroxidasa, sobresaliendo hasta el tercer muestreo la variedad Alfa. En la modalidad con fungicida la variedad Zafiro se mantuvo por arriba de la actividad de la variedad Alfa, excepto en el segundo y tercer muestreo donde Alfa supero a Zafiro, en el cuarto muestreo estos tratamientos no presentaron diferencias estadísticas. Estos resultados concuerdan con Velazhahan y Vidhyasekaran (1994), quienes encontraron que la actividad de la polifenoloxidasa y peroxidasa fue menor en las variedades susceptibles de *Arachis hypogaea* L. a *Puccinia arachidis* Speg., que en las resistentes. Jankiewicz y Sobiczewski (2003), demostraron en frijol que los cultivares resistentes como susceptibles a hongos patógenos producen la faseolina, sin embargo las plantas resistentes producen este compuesto más rápidamente y en cantidades mayores que las plantas susceptibles.

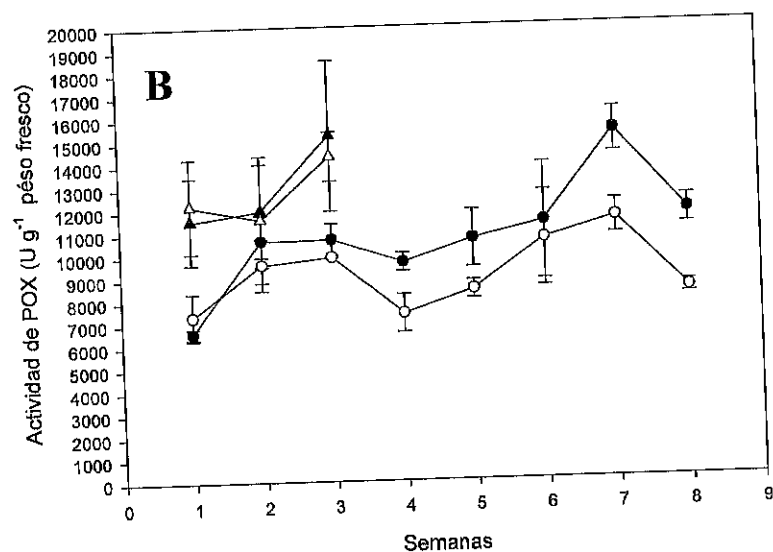
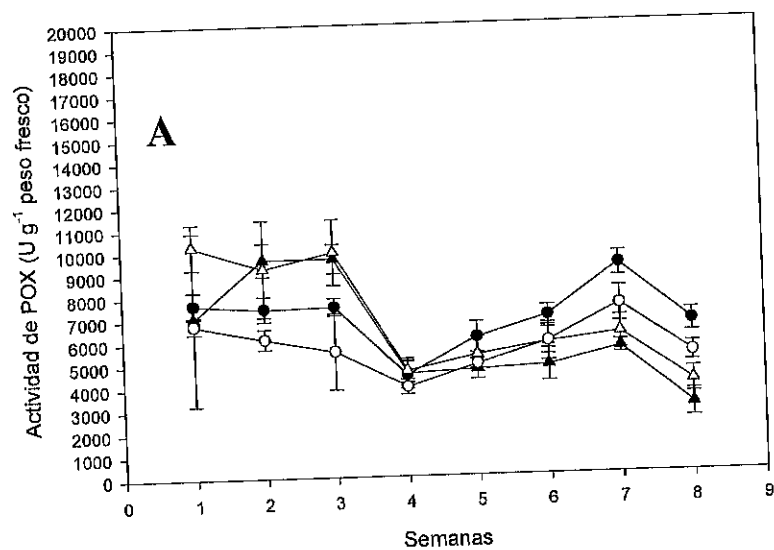


Figura 5. Actividad de la peroxidasa para los tratamientos de Alfa con virus ▲; Alfa sin virus Δ; Zafiro con virus ●; Zafiro sin virus ○; con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

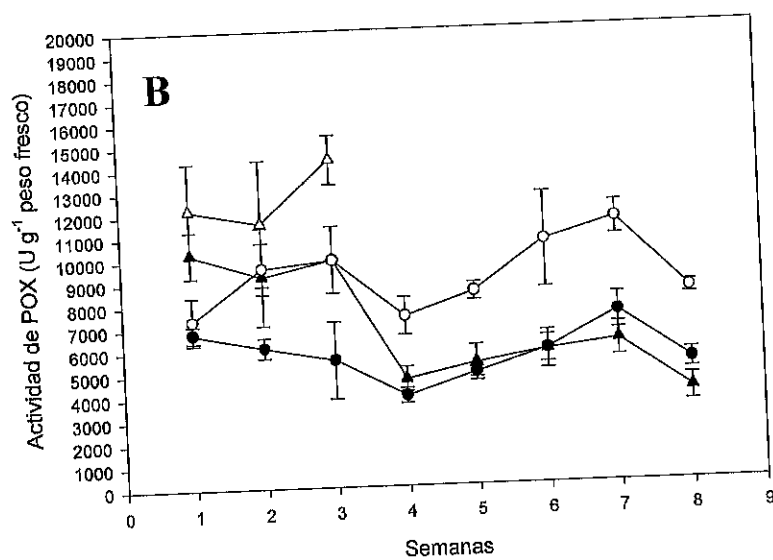
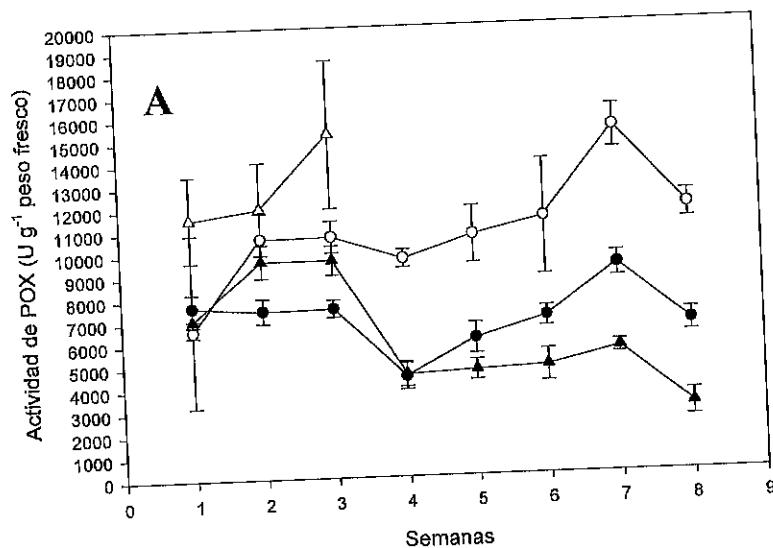


Figura 6. Actividad de la peroxidasa para los tratamientos de Alfa con fungicida $\blacktriangle$; Alfa sin fungicida Δ ; Zafiro con fungicida $\bullet$; Zafiro sin fungicida O; con (A) y sin (B) virus. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

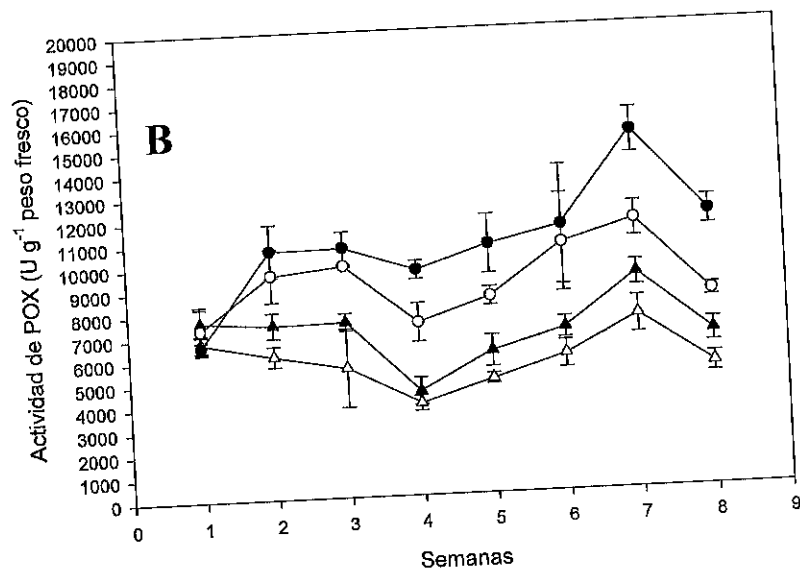
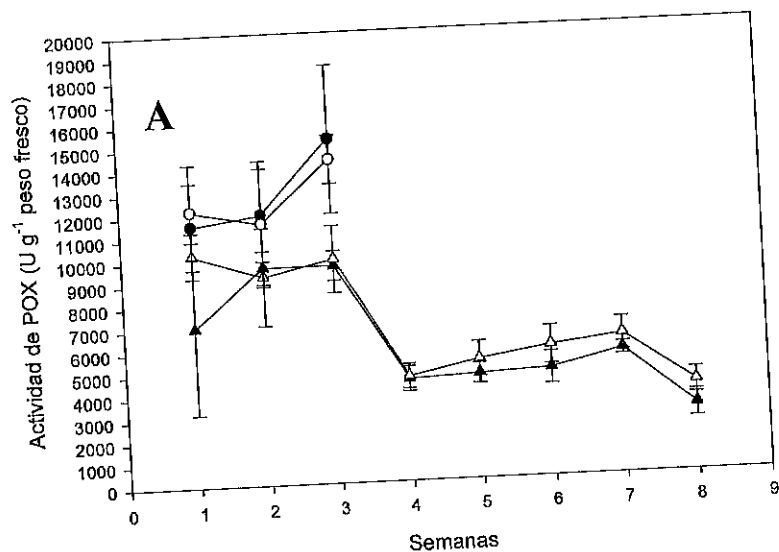


Figura 7. Actividad de la peroxidasa para los tratamientos con virus con fungicida ▲; sin virus con fungicida Δ; con virus sin fungicida ●; sin virus sin fungicida ○; en las variedades Alfa (A) y Zafiro (B). Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

Hubo mayor actividad de peroxidasas en la variedad Alfa que en la variedad Zafiro con/sin virus y con/sin fungicidas al principio (hasta el tercer muestreo). En la modalidad con fungicida, en el primer muestreo el tratamiento Alfa sin virus con fungicida supero a Zafiro sin virus con fungicida con $10256.4 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$, presentando diferencias estadísticas, su comportamiento fue el mismo, hasta en el sexto muestreo donde las variedades Alfa y Zafiro presentaron $5783.6 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$ y $5813.6 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$ respectivamente, no presentando diferencias estadísticas entre ellas. Al final del muestreo, en la semana ocho Zafiro sin virus con fungicida supero a Alfa sin virus con fungicida con $5233.4 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$ presentando diferencias estadísticas entre ellas (Figura 6). Dentro de la variedad Zafiro los tratamientos sin fungicida presentaron los valores más altos en actividad de peroxidasa a lo largo del periodo de evaluación, respecto a los tratamientos con fungicida. Los tratamientos con y sin fungicida en la modalidad con virus presentaron alta actividad en peroxidasa, respecto a la modalidad sin virus, estos resultados coinciden con Legrand *et al.* (1974). Ellos demostraron que la actividad de FAL, CA4H, OMT (catecol-O-metil transferasa) y peroxidasas, es incrementada en hojas de tabaco infectadas con VMT. Para la variedad Alfa sucedió lo mismo, los tratamientos sin fungicida presentaron valores más altos en la actividad de peroxidasa durante el periodo de muestreo, pero se presentó lo contrario para los tratamientos con fungicida, en la modalidad sin virus presentaron valores más altos en actividad de peroxidasa respecto a la modalidad con virus (Figura 7).

4.4 Actividad de Fenilalanina-amonio-liasa (FAL)

La actividad de la FAL para los tratamientos con fungicida fue muy baja, respecto a los tratamientos sin fungicida, esto indica que cuando hubo eliminación del patógeno por

Cuadro 3. Comparaciones de medias para la actividad de peroxidasas en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8	
	Media		Media		Media		Media		Media		Media		Media		Media	
Alfa CV/CF	6294.8	C	9644.6	AB	9639.4	BC	4520.7	C	4649.4	C	4771.5	B	5517.7	E	2958.9	F
Alfa SV/CF	10256.4	AB	9320.5	ABC	9932.6	BC	4634.5	C	5281.4	C	5783.6	B	6155.9	DE	3978.9	E
Alfa CV/SF	11801.0	A	12214.7	A	15295.5	A	0.0	D	0.0	D	0.0	C	0.0	F	0.0	G
Alfa SV/SF	12208.1	A	11595.5	A	14343.6	A	0.0	D	0.0	D	0.0	C	0.0	F	0.0	G
Zafiro CV/CF	7653.2	BC	7449.4	BC	7498.1	CD	4434.2	C	6047.4	C	6955.1	B	9196.0	C	6628.4	C
Zafiro SV/CF	6754.1	C	6112.2	C	5528.1	D	3920.3	C	4867.0	C	5813.6	B	7397.9	D	5233.4	D
Zafiro CV/SF	6572.2	C	10649.5	AB	10689.2	B	9658.9	A	10656.3	A	11620.0	A	15312.8	A	11777.2	A
Zafiro SV/SF	7323.5	BC	9596.1	AB	9918.1	BC	7393.2	B	8410.8	B	10604.4	A	11505.5	B	8342.5	B

Medias con letras iguales dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey $\alpha=0.05$.

CV: con virus; SV: sin virus; CF: con fungicida; SF: sin fungicida.

efecto del fungicida la actividad de FAL se mantuvo baja, ya que la planta no detecto la presencia del patógeno para inducir la actividad de FAL y por lo tanto síntesis de fitoalexinas. Jones (1984) señala que esta enzima es sensible a los estados fisiológicos de la planta y la actividad puede sufrir cambios durante el crecimiento o por eventos traumáticos o patológicos. A lo largo del periodo de muestreo aumentaron ligeramente la actividad de FAL en los tratamientos, excepto Zafiro sin virus con fungicida tuvo el máximo aumento en el quinto muestreo con $0.14165 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$ presentando diferencias estadísticas entre ellas y en el séptimo muestreo aunque tuvo mayor actividad, no presentaron diferencias significativas entre ellas (Figura 8 A). En el último muestreo presento baja actividad el tratamiento Alfa sin virus con fungicida con $0.05533 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$ y alta actividad el tratamiento Zafiro sin virus con fungicida con $0.06370 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$, no presentando diferencias estadísticas entre ellas (Cuadro 4).

En los tratamientos sin fungicida (Figura 8 B), en un principio los tratamientos con la modalidad sin virus se mantuvieron con actividad por encima que los de la modalidad con virus, pero al final del muestreo los tratamientos con la modalidad con virus superaron a los de la modalidad sin virus, lo que comprueba la hipótesis de que aumenta la presencia y actividad de las peroxidasas y FAL en las plantas expuestas a infecciones en relación directa a su resistencia genética contra enfermedades. El tratamiento Zafiro con virus alcanzó la máxima actividad al final del muestreo con $0.54180 \text{ U g}^{-1} \text{ p f}$; coincidiendo con Goodman, *et al.*, (1986), quienes mencionan que en los tejidos enfermos hay mayor actividad de la fenilalanina amonio-liasa, que es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina. En los tratamientos con y sin virus (Figura 9), la modalidad sin fungicida mantuvo la actividad de FAL por

Cuadro 4. Comparaciones de medias para la actividad de fenilalanina-amonio-liasas en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Alfa CV/CF	0.0189 A	0.0371 AB	0.0204 C	0.0330 AB	0.0229 CD	0.0674 B	0.0439 BC	0.0560 C
Alfa SV/CF	0.0220 A	0.0318 AB	0.0242 BC	0.0220 AB	0.0325 CD	0.0342 BCD	0.636 BC	0.0553 C
Alfa CV/SF	0.0350 A	0.0564 AB	0.1446 A	0.0000 B	0.0000 D	0.0000 D	0.0000 C	0.0000 C
Alfa SV/SF	0.0272 A	0.0803 A	0.0904 AB	0.0000 B	0.0000 D	0.0000 D	0.0765 BC	0.0637 C
Zafiro CV/CF	0.2909 A	0.0514 AB	0.0203 C	0.0206 AB	0.0507 CD	0.0289 CD	0.1226 B	0.0621 C
Zafiro SV/CF	0.0349 A	0.0318 AB	0.0184 C	0.0393 A	0.1416 AB	0.0432 BC	0.2578 A	0.5418 A
Zafiro CV/SF	0.0252 A	0.0183 B	0.0409 BC	0.0454 A	0.1881 A	0.1575 A	0.3000 A	0.3848 B
Zafiro SV/SF	0.0225 A	0.0530 AB	0.0765 ABC	0.0431 A	0.0947 BC	0.0621 BC		

Medias con letras iguales dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey $\alpha=0.05$.

CV: con virus; SV: sin virus; CF: con fungicida; SF: sin fungicida.

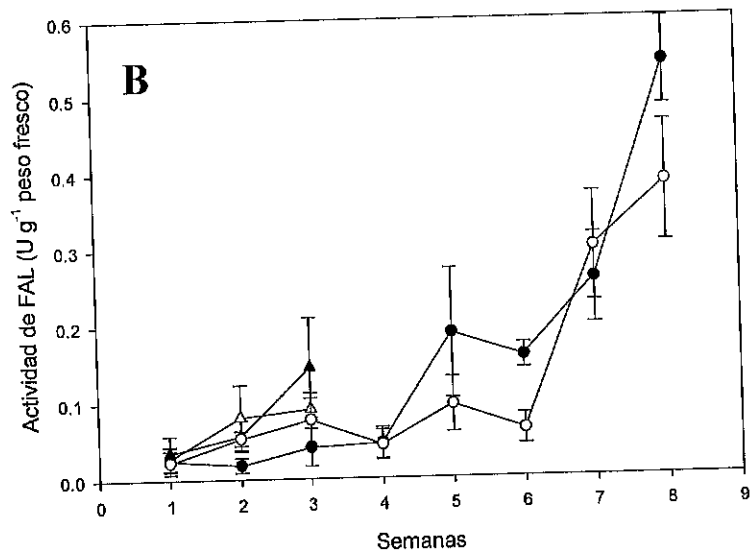
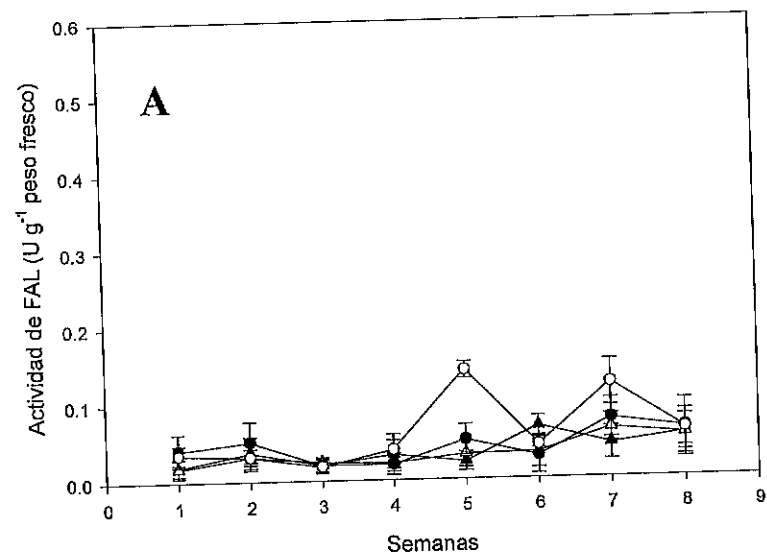


Figura 8. Actividad de la FAL para los tratamientos de Alfa con virus ▲; Alfa sin virus Δ; Zafiro con virus ●; Zafiro sin virus O; con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

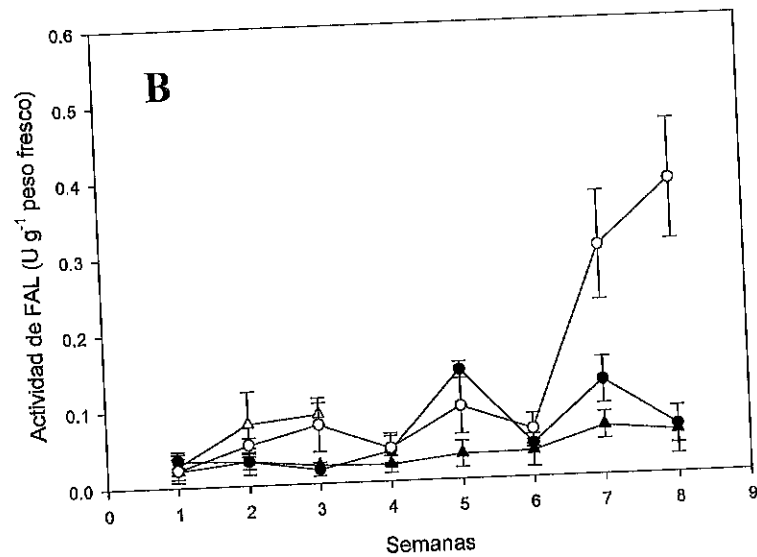
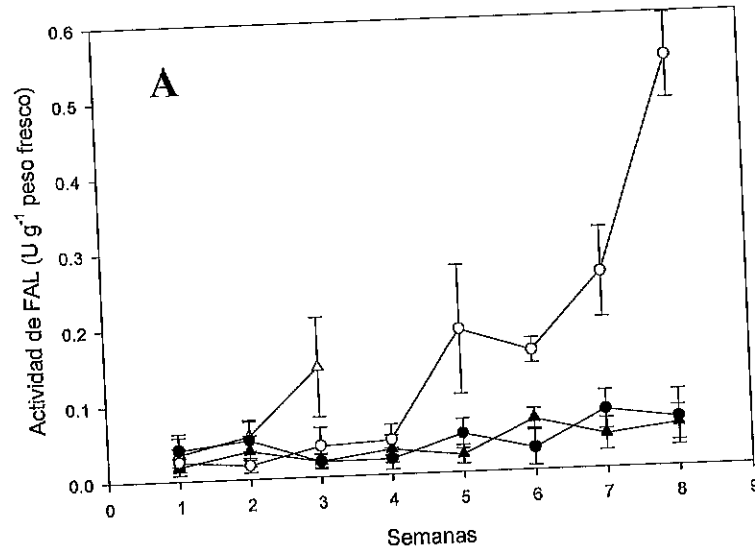


Figura 9. Actividad de la FAL para los tratamientos de Alfa con fungicida ▲; Alfa sin fungicida Δ; Zafiro con fungicida ●; Zafiro sin fungicida ○; con (A) y sin (B) virus. Cada punto representa la media de cuatro observaciones ± error estándar.

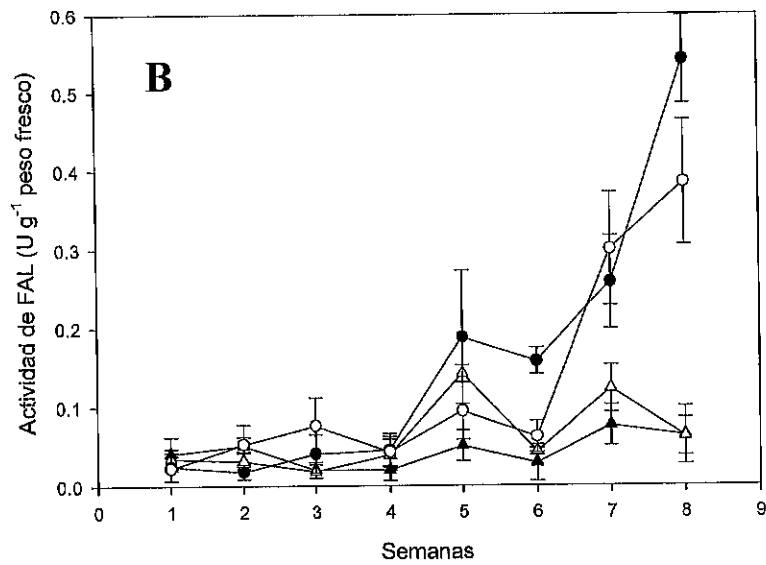
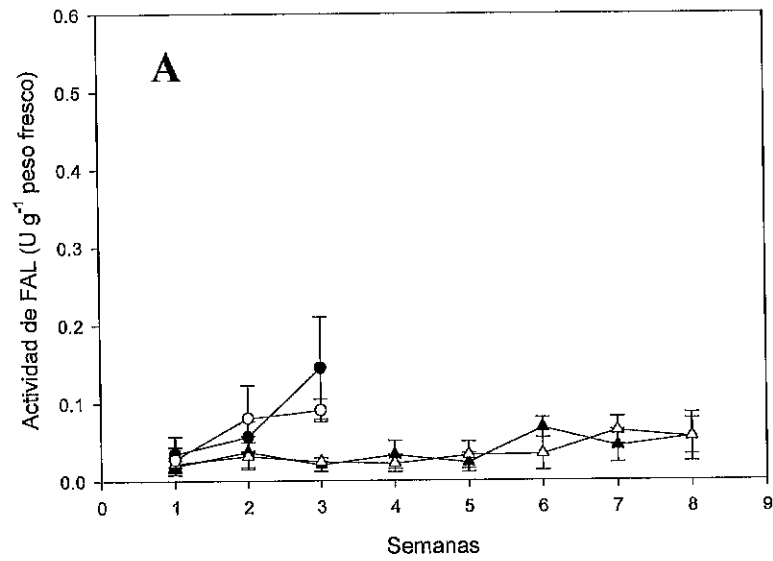


Figura 10. Actividad de la PAL para los tratamientos con virus con fungicida ▲; sin virus con fungicida △; con virus sin fungicida ●; sin virus sin fungicida ○; en las variedades Alfa (A) y Zafiro (B). Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

arriba de los tratamientos con la modalidad con fungicida. En el último muestreo los tratamientos con y sin virus con fungicida para las variedades Alfa y Zafiro no presentaron diferencias estadísticas. Cabe mencionar que los tratamientos de la variedad Zafiro se mantuvieron más altos que los tratamientos de la variedad Alfa durante el periodo de muestreo (Figura 10), presentando diferencias estadísticas, lo que coincide con Velazhahan y Vidhyasekaran (1994), quienes señalan que la actividad de fitoalexinas es más alta en plantas resistente que en plantas susceptibles. Independientemente de la variedad, los tratamientos sin fungicida presentaron alta actividad de FAL, este resultado coincide con Goodman, *et al.*, (1986), quienes mencionan que en tejidos enfermos es más alta la actividad de FAL.

4.5 Análisis de correlación

Las correlaciones entre variables para cada tratamiento tienen un valor de $\alpha=0.05$ y 0.01 , lo que significa que es significativo y altamente significativo respectivamente. Para el tratamiento de Alfa en presencia de virus con fungicida (Cuadro 5) hubo significancia estadística en la correlación fenoles/POX y POX/infección $r= -0.39^*$ y $r= -0.56^{**}$ respectivamente, estos valores en negativo indican que conforme aumenta la concentración de fenoles disminuye la actividad de POX; para el siguiente caso conforme pasa el tiempo, el porcentaje de infección aumenta y la actividad de POX disminuye. Además la correlación FAL/infección ($r= -0.44^*$) es estadísticamente significativo, lo que nos indica que existe una relación directa, la actividad de FAL aumenta conforme aumenta el porcentaje de infección. Por otro lado, sin fungicida, las correlaciones fenoles/POX, fenoles/FAL, fenoles/infección, POX/FAL y POX/infección son altamente significativas y presentan una relación directa. La correlación

fenoles/FAL esta ligada a la síntesis de fitoalexinas, la FAL es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de acuerdo con Goodman, *et al.*, (1986).

Alfa en ausencia de virus con fungicida, la relación fenoles/POX y POX/infección presentan significancia estadística ($r = -0.36^*$ y $r = -0.63^{**}$ respectivamente) e indican que si una aumenta la otra disminuye, es decir, tienen una relación inversa. La correlación fenoles/infección ($r = -0.45^{**}$) es altamente significativa y representa una relación directa (Cuadro 6).

Cuadro 5. Coeficientes de correlación entre las variables para la variedad Alfa en presencia de virus.

Variables		Fenoles	POX	FAL	Infección
Fenoles	CF	1.00	-0.39 *	0.03	-0.24
	SF	1.00	0.96 **	0.71 **	-0.77 **
POX	CF		1.00	-0.26	-0.56 **
	SF		1.00	0.79 **	-0.65 **
FAL	CF			1.00	0.44 *
	SF			1.00	-0.20
Infección	CF				1.00
	SF				1.00

*, ** indican significancia estadística con $p=0.05$ y 0.01 respectivamente.

CF, SF: señalan la condición de con y sin fungicida respectivamente.

Cuadro 6. Coeficientes de correlación entre las variables para la variedad Alfa en ausencia de virus.

Variables		Fenoles	POX	FAL	Infección
Fenoles	CF	1.00	-0.36 *	0.23	0.45 **
	SF	1.00	0.98 **	0.86 **	-0.65 **
POX	CF		1.00	-0.30	-0.63 **
	SF		1.00	0.85 **	-0.67 **
FAL	CF			1.00	0.29
	SF			1.00	-0.31
Infección	CF				1.00
	SF				1.00

*, ** indican significancia estadística con $p=0.05$ y 0.01 respectivamente.

CF, SF: señalan la condición de con y sin fungicida respectivamente.

Cuadro 7. Coeficientes de correlación entre las variables para la variedad Zafiro en presencia de virus.

Variables		Fenoles	POX	FAL	Infección
Fenoles	CF	1.00	-0.39 *	-0.18	0.68 **
	SF	1.00	0.27	0.15	0.54 **
POX	CF		1.00	0.04	-0.11
	SF		1.00	0.47 **	0.69 **
FAL	CF			1.00	-0.21
	SF			1.00	0.80 **
Infección	CF				1.00
	SF				1.00

*, ** indican significancia estadística con $p=0.05$ y 0.01 respectivamente.
CF, SF: señalan la condición de con y sin fungicida respectivamente.

Cuadro 8. Coeficientes de correlación entre las variables para la variedad Zafiro en ausencia de virus.

Variables		Fenoles	POX	FAL	Infección
Fenoles	CF	1.00	-0.09	0.34	0.78 **
	SF	1.00	0.14	0.16	0.69 **
POX	CF		1.00	0.14	-0.05
	SF		1.00	0.22	0.26
FAL	CF			1.00	0.51 **
	SF			1.00	0.71 **
Infección	CF				1.00
	SF				1.00

*, ** indican significancia estadística con $p=0.05$ y 0.01 respectivamente.
CF, SF: señalan la condición de con y sin fungicida respectivamente.

Para la variedad Zafiro en presencia de virus, con fungicida, la correlación fenoles/POX ($r = -0.39^*$) presenta significancia estadística. Cuando la concentración de fenoles aumenta, la actividad de POX disminuye, y caso contrario en la correlación positiva con fenoles/infección $r = -0.68^{**}$ (Cuadro 7). Sin fungicida existen varias correlaciones positivas, fenoles/infección, POX/FAL, POX/infección y FAL/infección son altamente significativas estadísticamente. La correlación POX/infección para el caso de la variedad Alfa fue negativa, lo que indica que la planta al tener alta actividad de POX no dejó que el patógeno se desarrollara ya que la actividad de las peroxidases con frecuencia

incrementan en respuesta a la infección (Rasmussen *et al.*, 1995) y en plantas infectadas, hay un incremento en una o más defensas en el sitio de infección cuando el patógeno desarrollado esta siendo detectado (Stein *et al.*, 1993).

En el caso de Zafiro sin virus, con y sin fungicidas, las correlaciones fenoles/infección y FAL/infección presentan significancia estadística alta, estas dos enzimas aumentaron la actividad conforme el porcentaje de infección aumentaba (Cuadro 8).

5. CONCLUSIONES

1. Las reacciones de defensa de la planta que mejor se identificaron fueron con la actividad de la peroxidasa y de la fenilalanina amonio-liasa, sin relación directa con la resistencia genética del hospedante al tizón tardío (Alfa tuvo más fenoles y POX que Zafiro).
2. Se detectó mayor actividad metabólica y resistencia temporal temprana en presencia del virus, independientemente de la resistencia genética del hospedante al oomiceto.
3. Los fungicidas indujeron una menor actividad de POX y FAL, principalmente en la variedad resistente.

6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 2001. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial UTEHA. México. 973 p.
- Alexander D.; Goodman R.M.; Gut-Rella, M.; Glascock, C.; Weymann, K.; Friedrich, L.; Maddox, D.; Ahl-Goy, P.; Luntz, T; Ward, E. and Ryals, J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1°. Proc Natl Acad Sci USA 90:7327-7331
- Alia_Tejacal, I.; Colinas León, M.T.; Martínez-Damián, M.T. y Soto-Hernández, M.R.. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) durante poscosecha. Revista Chapingo Serie Horticultura 8:263-271.
- Andreu, A.; Oliva, C.; Distel, S. and Daleo, G. 2001. Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tuber of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. Potato Research. 44:1-9
- Arz, CM. and Grambow, J.H. 1995 Elicitor and Suppressor Effects on Phospholipase C in Isolated Plasma Membranes Correlate with Alterations in Phenylalanine Ammonia-lyase Activity of Wheat Leaves. J. Plant Physiol. 146:64-70.
- Bailey, J.A. and Mansfield, J.W. 1982. Phytoalexins. Blackie Glasgow. Great Britain. 333 p.
- Bailey, J.A.; Vicent, G.G. and Burden, R.S. 1976. The antifungal activity of glutinosone and capsidiol and their accumulation in virus-infected tobacco species. Physiol. Plant. Pathol. 8:35-41

- Baker, C.J.; O'Neill, N.R. and Bauchan, G.R. 1988. Production of phytoalexins in race-clone interactions of alfalfa and *Colletotrichum trifolii*. In: Abstracts of presentations at the 1988 Annual Meeting of the American Phytopathological Society and the Pacific Division. *Phytopathology*. 12:1590.
- Buell, C.R. 2000. Genes Involved in Plant-Pathogen Interactions. In: *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture*. Edited by Anurag A. Agrawal, S. Tuzun, E. Bent. APS PRESS. pp 73-94 .
- Callow, J.A. 1983. *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley and sons. New York. 458 p.
- Chasan, R. 1995. S.A: Source or signal for SA? *Plant Cell*. 7:1519-1521
- Chet, I. 1993. *Biotechnology in plant disease control*. Wiley-LISS. Faculty of Agriculture Rehovot, Israel. 373 p.
- Cornide, M.T.; Lima, H. y Surli, J. 1994. La resistencia genética de las plantas cultivadas. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 194 p.
- Costa, J.J.; Margheritis, A.E. y Marisco, O.J. 1974. *Introducción a la terapéutica vegetal*. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 533 p.
- Cutt, J.R. and Klessig, D.F. 1992. Pathogenesis-related proteins. In: *Plant Gene Research*. Meins, F. and Boller, T. Eds. Springer-Verlag, New York. pp 181-216
- Dangyand, K. and Mikal, E.S. 1986. Effects of Calcicum and Auxin on Russet Spotting and Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Iceberg Lettuce. *HortScience* 21: 1169-1171.

- Darvil, A.G. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 243-257.
- Dercks, W. and Creasy, L. 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in *Plasmopara viticola*- grapevine interaction. *Physiol. and Molec. Plant Pathology*. 34:203-213
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9:275-296
- Flurkey, W.H. and Jen, J.J. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. of Food Sci.* 43:1828-1831.
- Fraser, R.S.S. 1987. *Biochemistry of Virus-Infected Plants*. Research Studies Press. Great Britain. 259 p.
- Goodman, R.N.; Király, Z. and Wood, K.R. 1986. *The biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press. Columbia. 268 p.
- Gordon-Weeks, R.; White, R.F. and Pierpoint W.S. 1991. Evidence for the presence of endogenous inducers of the accumulation of pathogenesis related PR-1 proteins in leaves of virus-infected tobacco plants and of an interspecific *Nicotiana* hybrid. *Physiol. Molec. Plant. Pathology* 38:375-392
- Goodwin, S.B. 1996. Origin and ecology of *Phytophthora infestans*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14:143-147
- Guiwen, W.C. and Breen, J.P. 1991. Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and concentrations of Anthocyanins and Phenolics in developing Strawberry Fruit. *J. Amer. Soc. Hort.Sci* 116:865-869.
- Hahlbrock, K. and Grisebach, H. 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann Rev. Plant Physiol.* 30:105-130

- Hahlbrock, K. and Grisebach, H. 1975. Biosynthesis of flavonoids. In: The Flavonoids. Harbone, J.B.; Mabry, T.J. and Mabry H. London: Chapman and Hall. pp 866-915
- Hammerschmidt, R.; Bonnen, A.M.; Bergstrom, G.C. and Baker, K.K. 1985. Association of epidermal lignification with nonhost resistance of cucurbits to fungi. Canadian Journal of Botany 63:2393-2398.
- Hardham, A.R. 1992. Cell biology of pathogenesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 43:491-526
- Henfling, J.W. 1987. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Segunda edición. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru (Boletín de Información Técnica No. 4). 25 p.
- Jankiewicz, L. y Sobiczewski, P. 2003. Las fitoalexinas y otras sustancias relacionadas con la resistencia de las plantas a los patógenos. In: Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Volumen 1. Propiedades y acción. Edit: Jankiewicz L. Ediciones mundi prensa. pp 427-454
- Jones, D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. Phytochemistry 23:1349-1359.
- Klarman, W.L. and Hammerschlag, F. 1972. Production of the phytoalexin, Hydroxiphaeollin, in soybean leaves inoculated with Tobacco Necrosis Virus. Phytopathology 62:719-721.
- Kuč, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology. 33:275-279
- Kuč, J. and Currier, W. 1976. Phytoalexins, plants, and human health. Adv. Chem. Ser. 149:356 368

- Legrand, M.; Fritig, B. and Hirth, L. 1976. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of the hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*. 15: 1353-1359.
- Liu, D.; Raghothama, K.G.; Hasegawa, P.M. and Bressan R.A. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc Acad Sci USA*. 91:1888-1892
- Lyon, G.D. and Albersheim, P. 1982. Host-pathogen interactions XXI. Extraction of a heat-labile elicitor of phytoalexin accumulation from frozen soybean stems. *Plant. Physiol*. 70:406-409
- Martínez-Téllez M.A. and Lafuente, M.T. 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled fortune mandarin fruit. *J. Plant Physiol*. 150:674-678.
- McKinney, H.H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agr. Res*. 39: 557-578
- Mendoza Z.C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 88 p.
- Müller, K.O. 1958. Studies on Phytoalexins. 1. The formation and immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. *Aust. J. Biol. Sci*. 11:275-300
- Müller, K.O. and Munro, J. 1951. The reaction of virus infected potato plants to *Phytophthora infestans*. *Ann. Appl. Biol*. 38:765-773.
- Nicholson, R.L., and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. of Phytopathology*. 30:369-389

- Patil, S.H.; Hedge, R.K. and Anahosur, K.H. 1985. Role of sugars and phenols in charcoal rot resistance of sorghum. *Phytopathol. Z.* 113:30-35.
- Paxton, J.D. 1981. Phytoalexins- a working redefinition. *Phytopathol. Z.* 101:106-109
- Podila, G.K.; Dickman, M.B. and Kolattukudy, P.E. 1988. Transcriptional activation of a cutinase gene in isolated fungal nuclei by plant cutin monomers. *Science.* 242:922-925
- Rasmussen, J.B.; Smith, J.A.; Williams, S.; Burkhart, W.; Ward, E.; Somerville, S.C.; Ryals, J. and Hammerschmidt, R. 1995. cDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to diseases in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46:389-400.
- Ride, J.P. 1978. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. *Annals of Applied Biology.* 89:302-306
- Robinson D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: P. F. Fox. *Food enzymology*. Vol. 1. Elsevier, London. pp. 399-426.
- Romero C.S. 1988. Hongos fitopatógenos. Patronato Universitario. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.
- Schonbeck, F. and Schlosser, E. 1976. Preformed substances as potential protectants. *In: Physiological Plant Pathology*. Eds: Heitefuss R, Williams PH, *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Ser. 4, Springer-Verlag, Berlin, pp. 653-678.
- Slusarenko, A.J.; Fraser, R.S.S. and Van Loon, L.C. 2001. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Publishers. 620 p.

- Stein, B.D.; Klomparens, K. and Hammerschmidt, R. 1993. Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants to *Colletotrichum lagenarium*. Journal of Phytopathology. 137:177-188.
- Stevenson, W. R. 1991. Late blight. In: compendium of Tomato Diseases. Eds. Jones, J.B.; Jones, J.P.; Stall, R.E. and Zitter, T.A. APS. Press. St. Paul Minnesota, U.S.A. pp 108- 113
- Szakiel, A. 1991. Papel de las fitoalexinas en la resistencia natural de plantas (en polaco). Postępy Biochemii, 37: 104-112.
- Velazhahan, R. and Vidhyasekaran, P. 1994. Role of phenolic compounds, peroxidase and polyphenol oxidase in resistance of groundnut to rust. Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica.29:23-29.
- Waterman, P.G. and Mole, S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- White, R.F. and Antoniow, J.F. 1991. Virus-induced resistance responses in plants. Plant Sci. 9:443-445.
- Yoshikawa, M.; Tsuda, M. and Takeuchi, Y. 1993. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. Naturwissenschaften. 80:417-420
- Zeringue, H.J. Jr. 1990. Stress effects on cotton leaf phytoalexins elicited by cell free-mycelia extracts of *Aspergillus flavus*. Phytochemistry. 29:1789-1791.

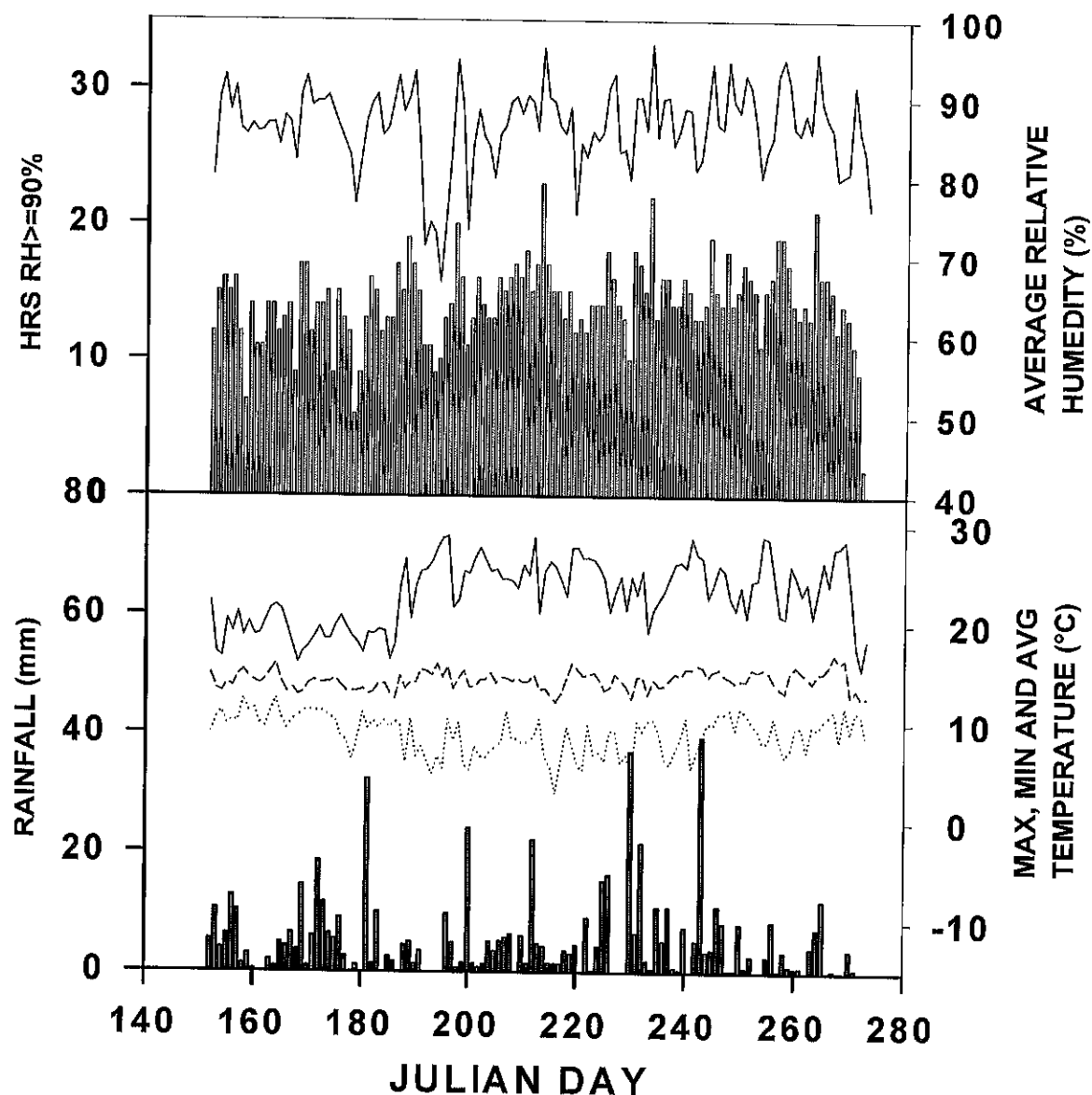
7. APÉNDICE

Apéndice 1. Clave de campo para evaluar el tizón tardío de la papa.

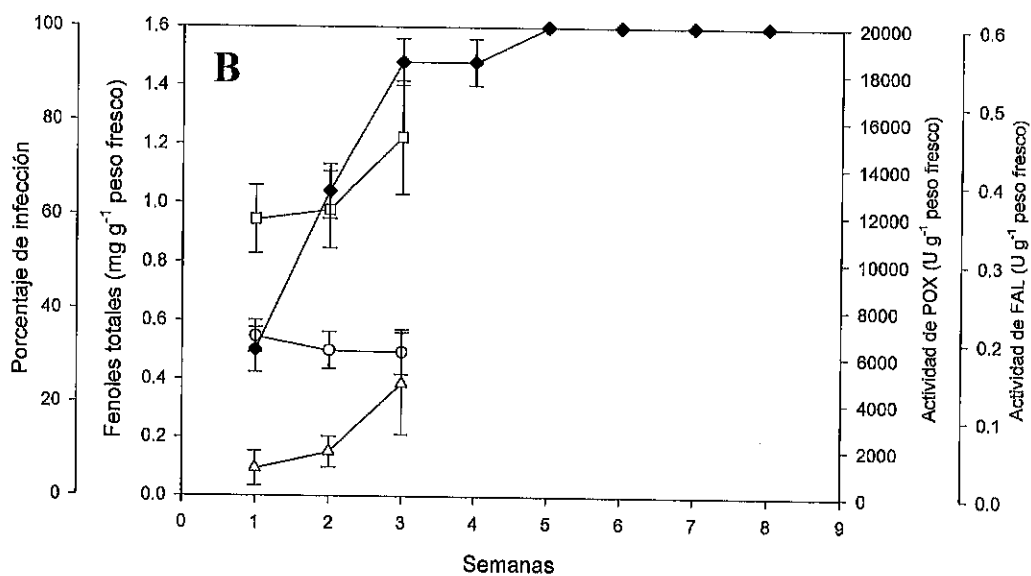
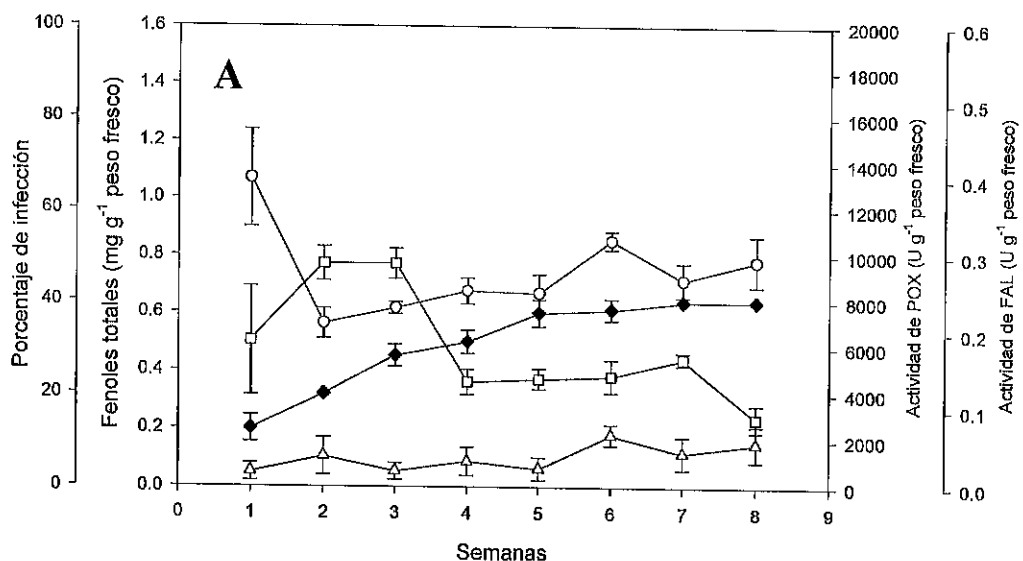
Valores escala del CIP	Tizón (%)		
	Media	Límites	Síntomas
1	0		No se observa tizón tardío
2	2.5	<5	Tizón tardío presente. Máximo 10 lesiones por planta.
3	10	5<15	Las plantas parecen sanas, pero las lesiones son fácilmente vistas al observar de cerca. Máxima área foliar afectada por lesiones o destruida corresponde a no más de 20 folíolos.
4	25	15<35	El tizón fácilmente visto en la mayoría de las plantas. Alrededor del 25% del follaje está cubierto de lesiones o destruido.
5	50	35<65	La parcela luce verde, pero todas las plantas están afectadas; las hojas inferiores muertas. Alrededor del 50% del área foliar está destruida.
6	75	65<85	La parcela luce verde con manchas pardas. Alrededor del 75% de cada planta está afectada. Las hojas de la mitad inferior de las plantas están destruidas.
7	90	85<95	La parcela no está predominantemente verde ni parda. Sólo las hojas superiores están verdes. Muchos tallos tienen lesiones extensas.
8	97.5	95<100	La parcela se ve parda. Unas cuantas hojas superiores aún presentan algunas áreas verdes. La mayoría de los tallos están lesionados o muertos.
9	100		Todas las hojas y los tallos están muertos.

La descripción de síntomas se basa en plantas con 4 tallos y de 10 a 12 hojas por tallo.

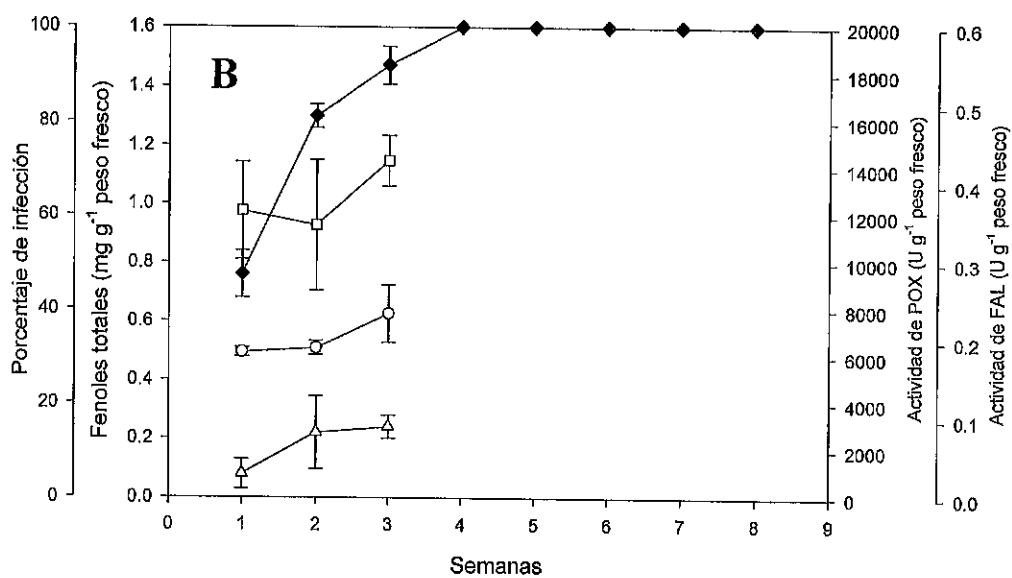
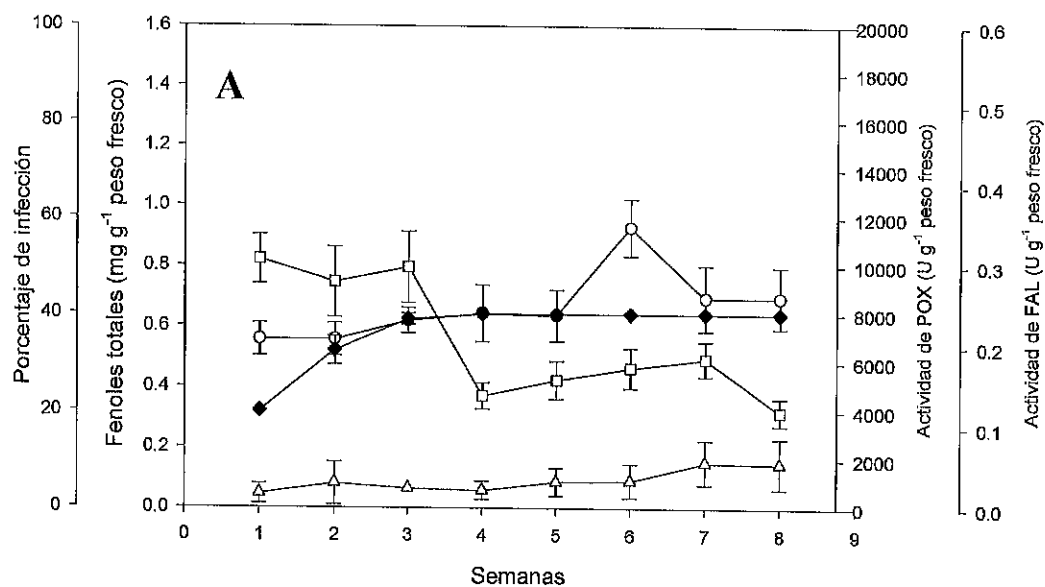
Apéndice 2. Precipitación diaria (mm); temperatura diaria máxima, mínima y media (°C); humedad relativa media diaria (%) y número de horas durante la cual la humedad relativa esta arriba del 90% (Hrs RH $\geq$ 90%) durante el periodo de crecimiento de la papa. Toluca, México, 2003. (Cuadro 4. Comparaciones de medias para la actividad de fenilalanina-amonio-liasa en cada uno de los tratamientos. Cortesía de Gaspar Romero M. y Claudia Belmar D.).



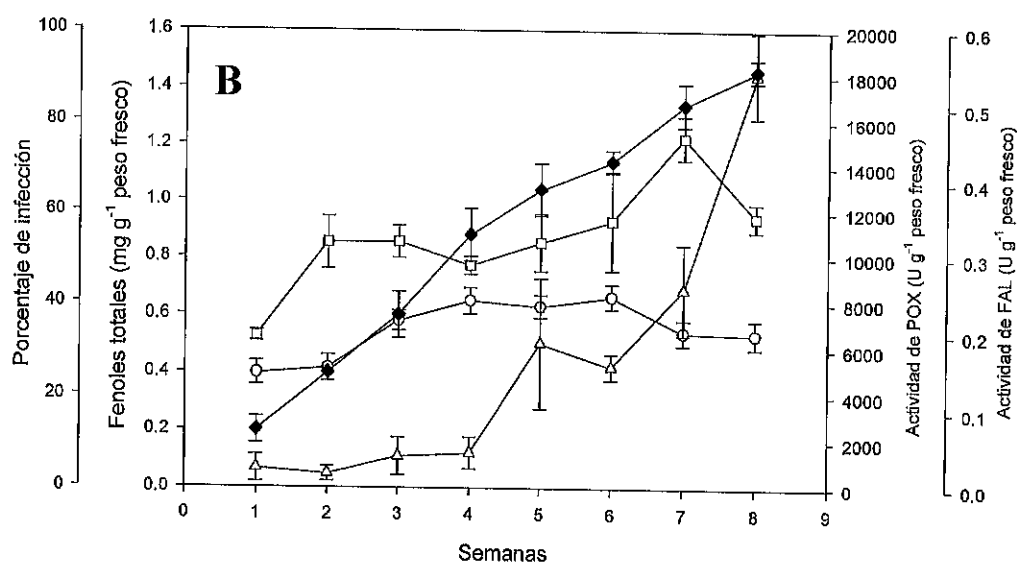
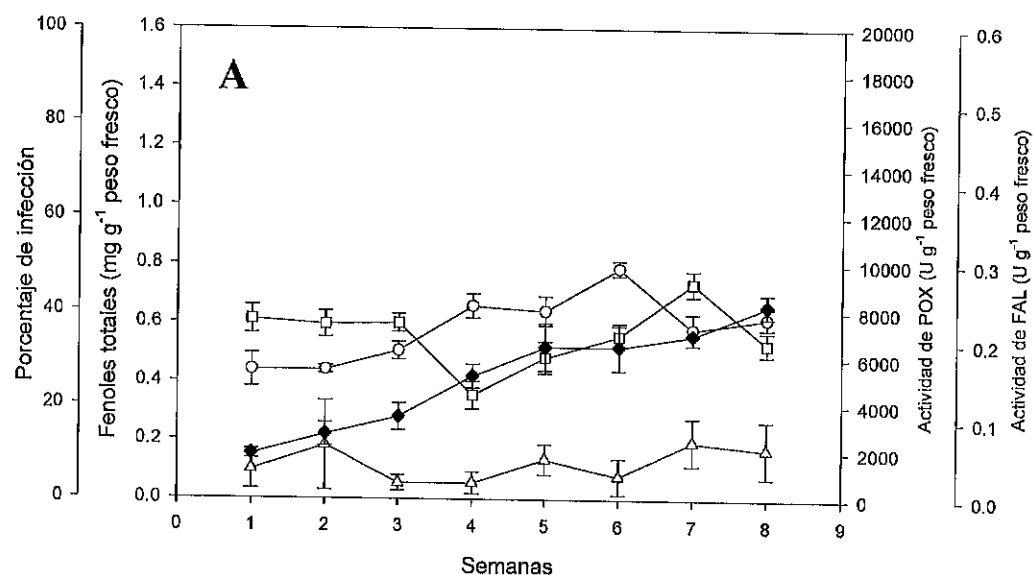
Apéndice 3a. Fenoles totales (○), Actividad de POX (□), Actividad de FAL (△) y porcentaje de infección(♦) para Alfa con virus con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones ± error estándar.



Apéndice 3b. Fenoles totales (○), Actividad de POX (□), Actividad de FAL (△) y porcentaje de infección(♦) para Alfa sin virus con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones ± error estándar.



Apéndice 3c. Fenoles totales (○), Actividad de POX (□), Actividad de FAL (△) y porcentaje de infección (◆) para Zafiro con virus con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones ± error estándar.



Apéndice 3d. Fenoles totales (○), Actividad de POX (□), Actividad de FAL (Δ) y porcentaje de infección(♦) para Zafiro sin virus con (A) y sin (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones ± error estándar.

