



"Enseñar la Explotación de la
Tierra No la del Hombre"

Universidad Autónoma Chapingo

Departamento de Parasitología Agrícola

Maestría en Protección Vegetal

Reacciones de defensa de especies silvestres de *Solanum* spp.
contra el ataque de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, En el
Valle de Toluca, Edo. De México.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

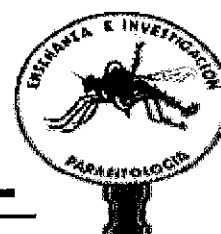
PRESENTA:

AIDA JUAREZ CRUZ

Chapingo, Estado de México, Junio de 2008



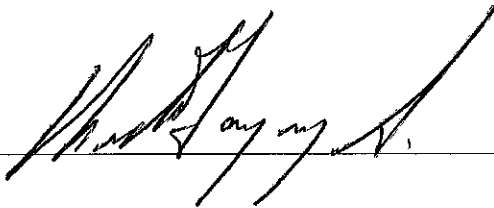
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Reacciones de defensa de especies silvestres de *Solanum* spp. contra el ataque de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, En el Valle de Toluca, Edo. De México.

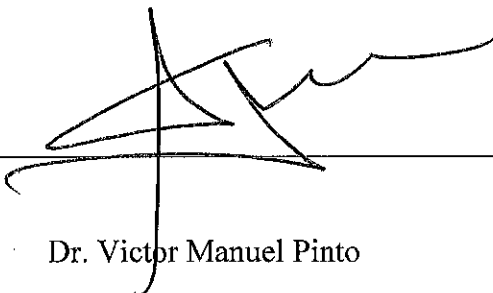
El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Aida Juárez Cruz de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

DIRECTOR



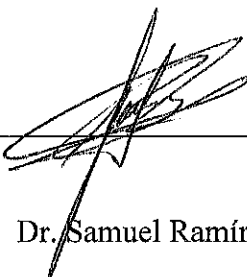
Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR



Dr. Victor Manuel Pinto

ASESOR



Dr. Samuel Ramírez Alarcón

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
DATOS BIOGRÁFICOS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
2.3. Hipótesis.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. Mecanismos bioquímicos activados por un patógeno.....	4
3.2. Reacciones de la planta a un patógeno.....	5
3.3. Resistencia genética	7
3.3.1. Resistencia horizontal	8
3.3.2. Resistencia vertical	8
3.3.3. Modelo Gen a Gen	9
3.4. Actividad de enzimas en la resistencia a <i>P. infestans</i>	11
3.4.1. Fenoles totales.....	11
3.4.2. Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL).....	12
3.4.3. Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX)	13
3.4.4. Superóxido Dismutasa (1.15.1.1 SOD).....	14
3.5. Infección por <i>P. infestans</i>	15
3.6. Plantas Silvestres de papa (<i>Solanum spp</i>)	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1. Localización del experimento	18
4.2. Material vegetal.....	18
4.3. Primera etapa CAMPO.	19
4.4. Segunda etapa LABORATORIO.....	21
Polvo de acetona	21
4.5. Variables a evaluar.....	21
4.5.1. Progreso de la enfermedad	21
4.5.2. Fenoles totales.....	22
4.5.3. Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)	23

4.5.4. Peroxidasa (EC1.11.1.7 POX)	23
4.5.5. Superóxido dismutasa (1.15.1.1 SOD).....	24
4.5.6. Análisis de resultados.....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1. Porcentaje de infección.	25
5.1. Fenoles totales.....	26
5.2. Fenilalanina amonio-liasas (EC4.3.1.5 PAL).....	27
5.3. Peroxidasas (EC1.11.1.7 POX).....	29
5.4. Superoxido dismutasa (1.15.1.1 SOD).....	30
5.5. Análisis de correlación.....	32
5.5.1. <i>Solanum microdontum</i>	32
5.5.2. <i>Solanum demissum</i>	32
5.5.3. <i>Solanum pinnatisectum</i>	33
5.5.4. <i>Solanum tuberosum</i>	33
6. CONCLUSIONES.....	36
7. LITERATURA CITADA.....	37
8. APÉNDICES.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Reacciones de defensa de la planta a un patógeno (Hammon and Jones, 1996)	5
Figura 2. Esquema de las reacción de defensa de una planta infectada por un hongo fitopatógeno con penetración directa (Jankiewicz y Sobiczewski, 2003).....	7
Figura 3. Modelo de interacción “gen a gen” (Buchanan, <i>et al.</i> , 2000).....	10
Figura 4. Siembra en invernadero y en campo de las especies silvestres de <i>Solanum</i> spp. A) Sobres con semillas de especies silvestres de <i>Solanum</i> ; B) Siembra de semillas de especies silvestres de <i>Solanum</i> ; C) Charolas en el invernadero; D) campo utilizado para el transplante de especies silvestres de <i>Solanum</i> ; E y F) Transplante de especies silvestres de <i>Solanum</i> ; G. <i>Solanum demissum</i> recién plantada y H) Deshierbe manual el 19 de Agosto de 2006	20
Figura 5. Curva de infección de <i>S. tuberosum</i> , variedad Alpha, en el 2006.....	26
Figura 6. Concentración de fenoles totales de las especies silvestres de <i>Solanum</i> spp. —▲— <i>S. pinnatisectum</i> , —■— <i>S. demissum</i> , —✕— <i>S. tuberosum</i> y —◆— <i>S. microdontum</i>	27
Figura 7. Actividad de PAL en especies silvestres de <i>Solanum</i> spp. —▲— <i>S. pinnatisectum</i> , —■— <i>S. demissum</i> , —✕— <i>S. tuberosum</i> y —◆— <i>S. microdontum</i>	28
Figura 8. Actividad de POX en especies silvestres de <i>Solanum</i> spp. —▲— <i>S. pinnatisectum</i> , —■— <i>S. demissum</i> , —✕— <i>S. tuberosum</i> y —◆— <i>S. microdontum</i>	30
Figura 9. Actividad de SOD en especies silvestres de <i>Solanum</i> spp. —▲— <i>S. pinnatisectum</i> , —■— <i>S. demissum</i> , —✕— <i>S. tuberosum</i> y —◆— <i>S. microdontum</i>	31
Cuadro 1. Correlación de variables para <i>S. microdontum</i>	32
Cuadro 2. Correlación de variables para <i>S. demissum</i>	33
Cuadro 3. Correlación de variables para <i>S. pinnatisectum</i>	33
Cuadro 4. Correlación entre variables de <i>S. tuberosum</i>	34

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría (Generación 37)

A la Universidad Autónoma Chapingo por los estudios realizados.

Al departamento de Parasitología Agrícola, principalmente a todos los profesores que me tuvieron paciencia y me brindaron su apoyo sincero en sus enseñanzas.

A PICTIPAPA, por el apoyo brindado.

Al comité asesor por su asesoría en el desarrollo del presente trabajo. Por sus enseñanzas, aportaciones, dedicación y confianza. Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña, Dr. Victor Manuel Pinto y Dr. Samuel Ramírez Alarcón.

Al personal del Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia, en especial al Quim. Cecilio Bautista, por su apoyo incondicional en todo momento en el desarrollo, realización y análisis de los datos del presente trabajo.

A mis compañeros de Maestría.

DEDICATORIA

A Dios: por la oportunidad de subir un escalón más en mi vida profesional, por todo el amor de mi familia, pareja y amigos que me permitió recibir.

A mi familia:

Mis padres: Margarita Sabina Cruz Villaseñor, por ser mi inspiración, aliento y mi ángel de la guarda.

Ezequiel Juárez Olgún por su apoyo en todo momento.

Mi hermana Mariella Juárez Cruz por ser amiga y compañera.

Mi sobrino Carlitos porque para él su tía es maravillosa.

A mi mamá Pancha: por ser ejemplo de amor, lucha y fortaleza sobre cualquier adversidad.

A mi amor:

Enrique Rodríguez Chanona, por su apoyo e impulsarme en todo momento para la culminación de una etapa más de mi profesión pero principalmente por su amor a pesar de la distancia.

A mi mejor amiga:

Carolina Velasco García, por su amistad incondicional, sincera, única e irremplazable.

Toda persona tiene una vocación o misión específica en la vida.
Toda persona debe llevar a cabo un designio concreto que exige su cumplimiento. Por ello es irremplazable y su vida, irrepetible de este modo, la tarea de cada persona es única, así como la oportunidad específica de realizarla.

Víctor E Frankl

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de esta tesis nació en México, Distrito Federal (agosto de 1980). Realizo sus estudios básicos de primaria en la Escuela Primaria “Benito Pérez Galdos” y egreso de la Escuela Secundaria Diurna #267 “Teodoro Flores”. Sus estudios medio superior los llevó a cabo en el Colegio de Bachilleres No. 12 “Nezahualcoyotl”.

En la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División Ciencias Biológicas y de la Salud de la cual egreso en el año de 2004 obteniendo el título de Bióloga.

Ha trabajado básicamente en el ámbito de riesgo y protección ambiental. En agosto de 2005 ingreso en la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en el departamento de Parasitología en la Universidad Autónoma Chapingo

**Reacciones de Defensa de Especies
Silvestres de *Solanum* Spp. Contra El
Ataque De *Phytophthora Infestans* (Mont.) De
Bary, En El Valle De Toluca, Edo. De
México.**

Aida Juárez Cruz¹, Héctor Lozoya Saldaña²

RESUMEN

A fin de cuantificar las respuestas de defensa de especies silvestres de papa en lo referente a los cambios en presencia y actividad de fenoles totales (FEN), fenilalanina amonio-liasa (PAL), peroxidasa (POX) y superóxido Dismutasa (SOD), durante el verano de 2006 se expuso a infección natural por *Phytophthora infestans* a las especies *Solanum microdontum*, *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. tuberosum* en el Valle de Toluca, México. En *S. microdontum* se obtuvieron correlaciones significativas ($P=\alpha\leq 0.05$) entre FEN/PAL ($r=0.934098$) POX/SOD ($r=0.974500$) y PAL/POX ($r=0.786853$). En *S. demissum* entre FEN/PAL ($r=0.945933$) y POX/SOD ($r=0.876633$). En *S. pinnatisectum* entre FEN/PAL ($r=0.810134$), POX/SOD ($r=0.889704$) y FEN/POX ($r=0.95548$). Esto indica que la actividad de las enzimas y de los fenoles totales se incrementó conjuntamente a medida que el patógeno se establecía en el área, como respaldo a la resistencia genética del hospedante al oomiceto. Por otro lado, para *S. tuberosum* dicha actividad enzimática decreció, por su carácter de susceptibilidad al *P. infestans*, pues en esta especie las correlaciones fueron significativas, FEN/PAL ($r=0.971282$), POX/SOD ($r=0.929529$) y FEN/POX ($r=0.933001$), y solamente esta especie presentó síntomas de la enfermedad. Considerando la significancia estadística de las correlaciones entre las variables cuantificadas, con el presente estudio se demostró el carácter poligénico de la defensa genética de las especies silvestres del presente estudio contra el oomiceto.

Palabras clave: papa: FEN, PAL, POX, SOD, especies silvestres *Solanum* spp.

¹ Tesista. Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo

² Director de tesis. Profesor Investigador. Universidad Autónoma Chapingo

**Defense Reactions Of Wild *Solanum* Spp.
Against a *Phytophthora Infestans* (Mont.) De
Bary Attack In The Toluca Valley, In The
State Of Mexico**

Aida Juárez Cruz¹, Héctor Lozoya Saldaña²

ABSTRACT

In the summer of 2006 *Solanum microdontum*, *S. demissum*, *S. pinnatisectum*, and *S. tuberosum*, were exposed to natural infection by *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in the Toluca Valley, Mexico in order to quantify the defense responses of wild potato species to changes in the presence and activity of total phenols (FEN), phenyl-alanine ammonio-lyase (PAL), peroxidase (POX), and superoxide dismutase (SOD). There were significant correlations in *S. microdontum* ($P=\alpha\leq 0.05$) between FEN/PAL ($r=0.934098$), POX/SOD ($r=0.974500$), and PAL/POX ($r=0.786853$), in *S. demissum* between FEN/PAL ($r=0.945933$) and POX/SOD ($r=0.876633$); in *S. pinnatisectum* between FEN/PAL ($r=0.810134$), POX/SOD ($r=0.889704$) and FEN/POX ($r=0.95548$). These results indicate that the enzymatic activity and that of total phenols jointly increased as the pathogen established itself in the area, as support to the host's genetic resistance to the oomycete. On the other hand, enzymatic activity decreased in *S. tuberosum*, because of its susceptibility to *P. infestans*. In this species the correlations were significant FEN/PAL ($r=0.971282$), POX/SOD ($r=0.929529$) and FEN/POX ($r=0.933001$), and only this species showed symptoms of the disease. Considering the statistical significance of the correlations between the quantified variables, this study demonstrates the polygenic character of the genetic defense of the wild species of this study against the oomycete.

Key words: FEN, PAL, POX, SOD, wild *Solanum* spp.

¹ Thesis author. Master of Science in Plant Protection. Autonomous University Chapingo

² Thesis director. Research Professor. Autonomous University Chapingo

1. INTRODUCCIÓN

Las especies silvestres de plantas han desarrollado mecanismos de detección y defensa de patógenos, por lo tanto son fuentes valiosas de resistencia a las enfermedades y plagas, así como de tolerancia a las condiciones adversas del cultivo, porque éstas han tenido que evolucionar por sí mismas, según el principio de “la supervivencia del más fuerte, a diferencia de las plantas cultivadas y protegidas por el hombre en condiciones agronómicas adecuadas al cultivo (Ligarreto 2001).

Los mecanismos de defensa permiten detener el establecimiento de patógenos al organismo. Operan en forma constante en la planta y se basan en el uso de herramientas químicas y estructurales. Las herramientas químicas son la producción de una gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos. Los mecanismos de defensa activados por el patógeno permiten detener y prevenir la infección de los tejidos de la planta. Cuando la célula vegetal detecta la presencia de un patógeno, se activa una potente reacción de defensa inducida (Hinojosa, 2004).

El tizón tardío, *Phytophthora infestans*, originario del Valle de Toluca, en el centro de México, apareció casi simultáneamente en Europa y Estados Unidos en la década de 1830-1840. Posteriormente se reportó en Irlanda (Goodwin *et al.*, 1994; Goodwin, 1996). Se ha identificado nuevas variantes de tizón aún más agresivas y con tolerancia a fungicidas sistémicos convencionales. El desarrollo epidémico del tizón tardío depende en gran parte del efecto que tiene la humedad y la temperatura sobre las distintas etapas del ciclo de vida (Grünwald *et al.*, 2001).

Si los genotipos de papa expuestos a la infección natural no son atacados por la gran diversidad de razas del oomiceto presentes en el Valle de Toluca (Lozoya *et al.*, 2005), entonces dicha resistencia se considera multigénica u horizontal (Niederhauser, 1962). Esta resistencia se ha identificado en varias especies silvestres de *Solanum*, de donde se han tomado los genes para incorporarlos a papas comerciales. (Colon *et al.*, 1995; Flores- Crespo, 1969; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998; Hawkes, 1994). Respecto a las incluidas en este estudio, se les ha encontrado diverso grado de resistencia (Lozoya *et al.*, 1997), y a pesar de que, en general se sabe de esta característica, no se han estudiado las reacciones de defensa en estas especies. Por esta razón se asumió dicho estudio en el presente trabajo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- ∞ Estudiar algunas respuestas de defensa en especies silvestres de papa al ataque natural del tizón tardío (*Phytophthora infestans*).

2.2. Objetivos específicos

- ∞ Cuantificar las respuestas de defensa de especies silvestres de papa (*Solanum microdontum*, *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. tuberosum*) al oomycete *Phytophthora infestans*, expuestos a infección natural en el Valle de Toluca, México, en cuanto a los cambios en presencia y actividad (o la activación de los genes) de fenoles totales, Fenilalanina amonio-líasa (EC4.3.1.5 PAL), Peroxidasa (EC1.11.1.7 POX) y Superoxido Dismutasa (1.15.1.1 SOD).

2.3. Hipótesis

La actividad de las enzimas estudiadas (PAL, POX, SOD), así como la concentración de fenoles totales, son mayores en los genotipos resistentes que en los susceptibles, y que dicha activación demuestra el carácter poligénico de la resistencia.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Mecanismos bioquímicos activados por un patógeno.

El peróxido de hidrógeno tiene la función de activar los genes de defensa a través de la alteración del mecanismo redox, uno de esos genes activa a la fenilalanina amonio-liasa. Este mecanismo proporciona a los tejidos infectados precursores de naturaleza fenólica, susceptibles de transformarse en fitoalexinas que actuaran como defensa ante la infección. El H_2O_2 activa la acción de las peroxidasas para el inicio de la peroxidación de lípidos a través de radical hidroxilo (H^+) (Azcon y Talon, 1993).

El peróxido de hidrógeno puede ser eliminado por varias enzimas antioxidantes tales como las catalasas, las cuales se localizan en los peroxisomas y en las mitocondrias de las células y convierten en agua el peróxido de hidrógeno que se produce durante la respiración; las peroxidasas (Fig.1), que utilizan el peróxido de hidrógeno durante las reacciones de lignificación y la enzima Ascorbato peroxidasa localizada en los cloroplastos y en el citoplasma, eliminan el peróxido de hidrógeno utilizando ácido ascórbico para convertirlo en agua (García, *et al.*, 2004).

La enzima Superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ y lo convierte en peróxido de hidrógeno, se encuentra en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias de las plantas. El peróxido de hidrógeno producido por esta reacción enzimática puede a su vez ser eliminado por los mecanismos descritos con anterioridad (García, *et al.*, 2004).

CELL WALL

PLASMA MEMBRANE

Pathogen

Interplay of signals

Rip

anion channel

calcium channel

Ca²⁺

NADPH oxidase complex

O₂

O₂⁻

SOD

H₂O₂

HO₂⁻

+Fe²⁺

crosslinking of cell wall proteins

PGases

PGIPS

OGA

OGA-R

phospholipase

SA

HPase

lipoxygenase

jasmonic acid

C₂H₄ synthesis

ion fluxes

Rip

Rip

Pathogen

Interplay of signals

ascorbate peroxidase

H₂O₂

SA

Hallwells-Asada cycle

activated ascorbate / glutathione

redox status altered

catalase

H₂O

BA2H

O₂

benzoic acid

salicylic acid

C₂H₄

BAG

SAQ

phenolic accumulation

Phe

FAL

CA

phytoalexin accumulation

transcription factors activated

Apoptosis gene activation

Defense gene activation

Signal amplification

Protectant gene activation

PAL

CHS

P4H

glucanase

chitinase

thionin

lipoxygenase

proteinase inhibitors

ACC oxidase

EFE

GST

GP

Peroxidases

Inicialmente, cuando una célula de la planta reconoce un patógeno avirulento, puede desencadenar una respuesta de hipersensibilidad, que induce una producción de peróxido de hidrógeno, fitoalexinas y/u otros compuestos, que da como resultado la muerte de la misma y la destrucción del patógeno.

5

que producen sus células antes o después de haberse producido la infección (Agrios, 2001).

Una espora del hongo (Z, Fig.2), después de unirse a la pared de la célula de epidermis (PEp, Fig. 2), genera un apresorio (Ap, Fig.2) y empieza a formar el micelio que penetra a la pared celular del hospedante. El micelio segrega enzimas que destruyen esta pared celular del hongo (ETG, Fig.2). Los fragmentos de la pared destruida son los elicitores de la reacción de defensa (W_1 , Fig.2). Sin embargo, la célula del hospedero tiene también sus enzimas de defensa la que digieren la pared celular del hongo (ETG, Fig.2).

Los fragmentos desprendidos de ella sirven también como elicitores (W_2 , Fig.2). Asimismo las secreciones del hongo pueden servir como elicitores. Los elicitores se unen a los receptores correspondientes (R_1 , R_2 , Fig.2) y empiezan la transducción de la señal al núcleo la expresión de toda la gama de genes de defensa, entre otros, genes responsables de la producción de fitoalexinas. Estos genes generan los mRNAs para las enzimas (E_1 , E_2 , E_n , Fig.2) necesarias para la síntesis de los precursores ZW_1 , ZW_2 , ZW_3 de la fitoalexina (F_1 , Fig.2). Además, puede ocurrir la expresión de los genes responsables de los fenómenos llevando a la muerte rápida de la célula (reacción de hipersensibilidad =RH, Fig.2) o de la resistencia sistémica adquirida (RSA, Fig.2) y otras reacciones de defensa. Cp- plasmalema y las capas exteriores del citoplasma.

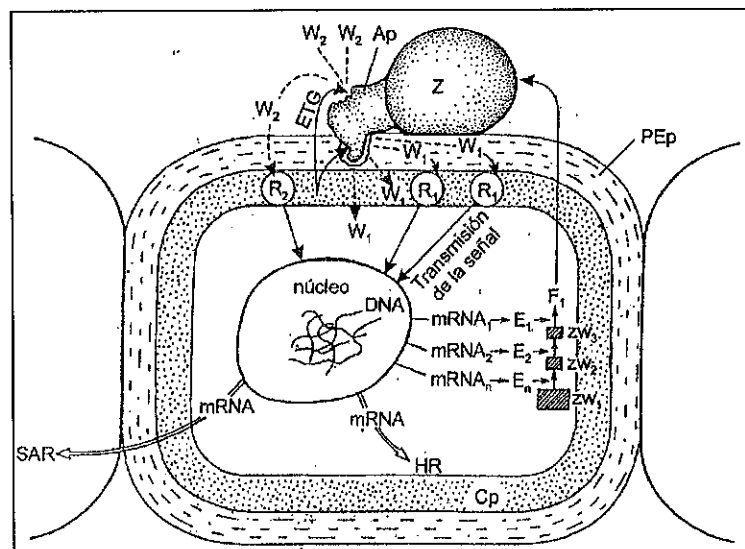


Figura 2.- Esquema de las reacción de defensa de una planta infectada por un hongo fitopatógeno con penetración directa (Jankiewicz y Sobiczewski, 2003)

3.3. Resistencia genética

Según Estrada (2000) *S. demissum* que es hexaploide, se le reconocieron 11 genes de resistencia, los cuales actúan por condición a una respuesta necrótica hipersensible, en las células invadidas por el oomiceto.

La habilidad de una planta de resistirse a la enfermedad es una característica heredada el cual se controla genéticamente. Las plantas sufren recombinación sexual y cambio genético. La habilidad de un patógeno de causar enfermedad también se hereda y se controla genéticamente. Los patógenos también cambian genéticamente. Algunos están compuestos de muchas razas, cada una que difiere en su habilidad de atacar un cultivar de un hospedero dado. Los cultivares que resisten a un solo agente patogénico poseen la resistencia raza-específica o vertical. Los cultivares que resisten a muchas agentes patogénicos poseen la resistencia no específica, horizontal o general (Lucas *et al.*, 1985).

3.3.1. Resistencia horizontal

La resistencia horizontal se presenta de distintas maneras, puede ser mediante la producción de exudados tóxicos en superficies de hojas, confinamiento de las estructuras fúngicas a las paredes celulares, escasa colonización y mesófilo, colapso lento de los peciolo y reducción del rango reproductivo del patógeno, es decir se presentan barreras fisiológicas y químicas en los tejidos del hospedante que retardan el rango, la frecuencia de penetración y la producción del oomiceto (Trujillo, 2004); es decir, todas las plantas tienen cierto nivel de resistencia no específica, pero no siempre la misma es eficaz contra cada uno de sus patógenos esta está bajo control de muchos genes de ahí el nombre de resistencia poligénica o de genes múltiples. En gran número de genes de resistencia horizontal controla las diferentes etapas fisiológicas de la planta (genera las sustancias y estructuras que constituyen mecanismos de defensa).

Este tipo de resistencia es caracterizada por una continua variación en apariencia fenotípica y herencia poligénica (Wastie, 1991). Ha sido derivada de especies silvestres como *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum* (Ross, 1986). Como regla general, la combinación de genes mayores y menores para resistencia contra el ataque del patógeno es la alternativa más conveniente para cualquier variedad vegetal. Cada uno de estos genes por separado es ineficaz para contrarrestar el efecto del patógeno y puede tener una función menor en la resistencia horizontal total de la planta (Agrios, 2001).

3.3.2. Resistencia vertical

El mejoramiento para la resistencia vertical puede tener como objetivo obtener cultivares de líneas puras con un gen (resistencia simple) o con varios genes (resistencia múltiple o

compleja). La resistencia múltiple o compleja se basa en la acumulación de genes que controlan la resistencia ante diferentes patotipos, como una vía de ganar en la estabilidad parietal. Es decir: muchas variedades vegetales son resistentes a un patógeno, pero susceptibles a otra raza del mismo patógeno. En otras palabras dependiendo de la raza del patógeno puede ser resistente a una pero susceptible a otra. También es llamada resistencia específica, cualitativa o diferencial. Generalmente es controlada por uno o algunos genes de ahí que puede ser resistencia monogénica o poligénica (Cordine *et al.*, 1985).

En general, las variedades que muestran resistencia específica muestran resistencia completa a un patógeno específico en la mayoría de las condiciones ambientales, pero una o varias mutaciones que ocurran en el patógeno pueden originar una nueva raza que entonces pueden infectar a la variedad anteriormente resistente. Por el contrario, las variedades que presentan resistencia general (poligénica) pueden o no ser menos estables y pueden variar en su reacción al patógeno bajo diferentes condiciones ambientales, pero el patógeno tendrá que pasar por muchas mutaciones para inhibir por completo la resistencia del hospedante (Agrios, 2001).

3.3.3. Modelo Gen a Gen

Según Wastie (1991) *S. demissum* presenta los dos tipos de resistencia, la general o de campo, que depende de la acción combinada de muchos genes y la resistencia específica a razas, cuya base genética es la relación gen a gen (Fig. 3.). Consiste en que un simple gen en el hospedero puede conferir resistencia a la planta si el patógeno tiene el gen complementario por avirulencia. Por lo tanto es una relación hospedante-patógeno que

tiene una evolución conjunta en equilibrio. Por cada gen que confiere resistencia a un hospedante hay un gen correspondiente en el patógeno que le confiere virulencia y viceversa.

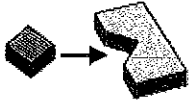
Genotipo del patógeno	Genotipo de la planta huésped	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 Avr1 Proteína R1 Planta no enferma (Planta y patógeno son Incompatibles)	 Avr1 Proteína r1 Planta enferma (Planta y patógeno son compatibles)
<i>avr1</i>	 avr1 Proteína R1 Planta enferma (Planta y patógeno son compatibles)	 avr1 Proteína r1 Planta enferma (Planta y patógeno son compatibles)

Figura 3. Modelo de interacción “gen a gen” (Buchanan, *et al.*, 2000)

La interacción específica entre hospedero y patógeno es por incompatibilidad. La susceptibilidad es estimada como un fenómeno pasivo a la ausencia de genes para resistencia y avirulencia. Así pues, la resistencia es estimada como un proceso activo (Goodman *et al.*, 1986).

La fuerte respuesta de defensa que se dispara después de una interacción de gen a gen incluye la síntesis de enzimas y metabolitos antimicrobianos, la generación de moléculas es la señal que activa la defensa en las células vecinas y el refuerzo de las paredes celulares que rodean el sitio de infección (Yu *et al.*, 1998).

3.4. Actividad de enzimas en la resistencia a *P. infestans*.

Dependiendo del patógeno que infecta puede variar el tipo de compuesto de defensa inducidos por la planta. El resultado es la inducción, de forma sistémica, de un plantel de proteínas y compuestos de defensa que incluyen proteínas enzimáticas de la vía de los fenilpropanoides (fenilalanina amonio-liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS), peroxidases (POX), etc. (Reymond y Faner, 1998).

3.4.1. Fenoles totales

Los fenoles están representados en las plantas por un grupo muy amplio de estructuras químicas, más de 8000, y se caracterizan por presentar un núcleo aromático de benceno, sustituido, como mínimo, con una función hidroxilo. Pero en general, los fenoles vegetales presentan estructuras más complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera y pigmentos de flores y frutos (Palazón *et al.*, 2005). Con frecuencia se ha observado que cierto compuestos fenólicos “comunes” que son tóxicos para los patógenos, se producen y acumulan a un ritmo mucho mayor después de haberse producido la infección en una variedad resistente que en una susceptible (Agrios, 2001).

Las enzimas que participan en la defensa se hallan asociadas, formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis. Pero estas estructuras, donde se da una alternancia de átomos con o sin oxígeno, son muy inestables, y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico (Bobey, 1989).

Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, en general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan con antioxidantes. También de una forma bastante general, los fenoles actúan como inhibidores del crecimiento de las plantas, aunque se han encontrado algunas estructuras, que de forma específica lo activan, al inhibir la degradación de una hormona vegetal que es la auxina. Los fenoles suelen acumularse en las capas más superficiales de los vegetales y captan hasta 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos de la planta. Aunque las acciones más características de estos compuestos son las de establecer relaciones químicas de las plantas con su entorno (Palazón, 2005).

3.4.2. Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)

La fenilalanina amonio-liasa (PAL) es la enzima clave del metabolismo de fenoles responsable de la acumulación de ligninas y flavonoides en las plantas (Bobey, 1989).

La acción de la PAL es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente modulada. Entre otros factores, esta enzima es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. También, en general, la actividad de la PAL aumenta cuando a los vegetales se les somete a situaciones de agobio, como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones UV. Otro factor que activa la enzima PAL es el frío, y por ello, las plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas. También es conocido que al florecer las plantas en primavera que siguen a inviernos muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos (Bobey, 1989).

Se ha observado que la actividad de la PAL aumenta considerablemente en zonas donde se ha producido una infección fúngica, así pues parece que los genes responsables de la síntesis de la enzima pueden responder a la presencia de elicitores biológicos, sintetizando mRNAs correspondientes, que se traducirán en proteínas con actividad de la PAL. Este mecanismo proporciona a los tejidos infectados precursores de naturaleza fenólica, susceptibles de transformarse en fitoalexinas que actuaran como defensa ante la infección (Azcon y Talon, 1993). El apagado de los genes de la PAL parece ser uno de los primeros pasos en el desarrollo del patógeno en hospederos susceptibles (Vidhyasekaran, 1997).

3.4.3. Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX)

La peroxidasa (POX) interviene en reacciones peroxidativas y oxidativas, además de la lignificación de la pared celular y en la degradación del ácido indolacético (Robinson, 1991). Se encuentra en el apoplasto y en el citoplasma de la célula (Camarena, 2006).

La simple inoculación con el patógeno estimula la producción directa de superóxido. La generación de las especies reactivas de oxígeno ocurren en dos fases, una inicial, que sucede minutos después de la adición del patógeno, y una secundaria que comienza de una a tres horas después que la fase inicial ha terminado (Camarena, 2006).

Los inductores de hongos y heridas inhiben la expresión de genes que codifican proteínas estructurales con bajo contenido de tirosina, pero estimulan la producción de proteínas ricas en tirosina (Kim *et al.*, 2002). Esto incrementa la capacidad de la pared celular para posteriores uniones cruzadas, por ejemplo, se ha observado una protección contra infecciones secundarias con aumento de los niveles de hidroxiprolina y

peroxidasa en la pared celular, esta última se encuentra también en el citoplasma (Camarena, 2006).

3.4.4. Superóxido Dismutasa (1.15.1.1 SOD)

La enzima superóxido dismutasa cataliza la dismutación del ion superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Como tal, es una defensa antioxidante importante para las células que se encuentran expuestas al oxígeno (UAP, 2007)

La superóxido dismutasa está presente en todos los organismos que respiran O. Están clasificadas en 3 diferentes grupos de acuerdo al metal que contienen en su estructura: las FeSOD se encuentran en procariontes y plantas, las MnSOD se encuentran también en procariontes y en la mitocondria, de los eucariontes, al igual que el Cu/Zn-SOD se encuentra en el peroxisoma, por último están las CuSOD que se encuentran en el citosol y en los compartimientos extracelulares de los eucariontes (Figura 3.), y también en el periplasma de bacterias Gram.-negativo (UAP, 2007).

Esta enzima probablemente protege a las células de la toxicidad del oxígeno. La alta producción de superóxido reactivo generado enzimáticamente o no enzimáticamente bajo alta tensión de oxígeno es transformado a H₂O₂ por superóxido de dismutasa. Es importante destacar que la enzima nunca ha sido encontrada en peroxisomas de plantas o animales donde se localiza la catalasa. Quizá el H₂O₂ producido es destruido por peroxidases en el exterior de los peroxisomas (Huang *et al.*, 1983).

3.5. Infección por *P. infestans*

La incidencia constante de una gran variedad de razas patogénicas de *P. infestans* y las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la enfermedad singularizan al Valle de Toluca como un lugar ideal para probar la efectividad de productos en el control químico del oomiceto así como la resistencia de clones y especies silvestres de papa. Cualquier producto que controle la enfermedad en el Valle garantiza un comportamiento similar o mejor en cualquier otra área productora de papa en el mundo (Lozoya y Hernández, 2001).

3.6. Plantas Silvestres de papa (*Solanum* spp)

Las especies silvestres constituyen un recurso importante para los mejoradores que seleccionan germoplasma por resistencia a enfermedades causadas por hongos. En 1908 la especie *S. demissum*, originaria de México y con resistencia monogénica al oomiceto *P. infestans* (tizón tardío), sirvió para transferir este carácter a la papa cultivada, resistencia que sólo duró pocos años porque aparecieron nuevas razas del oomiceto. No obstante, la especie ha servido para mejorar la producción de papa durante varias décadas. Aún hoy en día esta papa silvestre proporciona genes menores de resistencia en variedades cultivadas, y el International Potato Center (CIP) ha ayudado, por su parte, a liberar variedades en varios países partiendo de *S. demissum* (Ligarreto, 2001). Esta papa mexicana ha conferido a variedades comerciales de papa, genes para la resistencia no solo de *P. infestans* sino también a la marchitez bacteriana, varios virus y nemátodos, así como la tolerancia a la helada.

S. demissum tiene genes mayores (R) de resistencia de *P. infestans*. Esta resistencia se han transferido a la papa cultivada, aunque en muchas de las variedades obtenidas de estas cruas, dicha resistencia ya se ha perdido (Colon *et al.*, 1995). Se debe contar con información adecuada sobre el nivel de resistencia al oomiceto, para predecir la durabilidad de la resistencia (Latin *et al.*, 1981).

De los componentes de resistencia que se han medido en especies silvestres de *Solanum*, así como en variedades con diferente grado de resistencia o susceptibilidad al oomiceto son: eficiencia de la infección, tasa de crecimiento de la lesión, capacidad y período de infección, probabilidad de infección y periodo latente. Estos componentes varían entre especies y dentro de las especies (Colon *et al.*, 1995; Cañizarez y Forbes, 1995; Guzmán-N, 1964; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006).

S. pinnatisectum, es una especie utilizada para el mejoramiento de la papa por su resistencia al oomiceto (Kolovayev, 2002).

En *S. tuberosum* hay cuatro genes dominantes relacionados con la resistencia a la infección del tizón tardío: R1 al R4. Se han identificado siete genes adicionales, 5 de los cuales son alelos del complejo locus R3, de un total de 11 genes dominantes R (Cummins, 2006). La resistencia parcial de *S. tuberosum*, que se presume es poligénica y parece ser durable puede ayudar a proteger al cultivo de papa de *P. infestans* (Wastie, 1991). La resistencia parcial comprende algunas reacciones de la planta a la enfermedad que se pueden medir individualmente. Estas pueden ser el retraso en la penetración, una penetración menor al tejido, menor proporción de invasión del tejido de la planta y poca esporulación del oomiceto (Guzmán, 1964).

La eficiencia de infección, periodo latente y tasa de crecimiento de la lesión fueron importantes en *S. microdontum* mientras que la eficiencia de infección, tasa de crecimiento de la lesión y capacidad de esporulación fueron importantes en *S. tuberosum* (Colon *et al.*, 1995).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del experimento

Primera etapa –CAMPO–: se realizó la siembra de semillas de cada especie de papa silvestre en los invernaderos de la Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, posteriormente durante el verano de 2006, la investigación se situó en los campos experimentales de PICTIPAPA (Programa Internacional Cooperativo de Tizón Tardío de la Papa) en Metepec en el Valle de Toluca, Estado de México (conjunto SEDAGRO).

Segunda etapa –LABORATORIO–: las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo.

4.2. Material vegetal

Se utilizaron semillas de papa silvestre proporcionadas por Potato Introduction Project, USDA (Figura 4. A):

<i>S. berthaultii</i> ,	<i>S. iopetalum</i> ,
<i>S. bulbocastanum</i> ,	<i>S. microdontum</i> ,
<i>S. cardiophyllum</i> ,	<i>S. okadae</i> ,
<i>S. circaeifolium</i> var. <i>capsicibaccatum</i> ,	<i>S. pinnatisectum</i> ,
<i>S. demissum</i> ,	<i>S. polyadenium</i> ,
<i>S. gourlayi</i> subs. <i>gourlayi</i> ,	<i>S. stenophyllidium</i> ,
<i>S. hougasii</i> ,	<i>S. stoloniferum</i> ,

S. tridum.

S. x sucrense

S. tuberosum .

4.3. Primera etapa CAMPO.

Se sembraron 20 semillas de las especies silvestres de *Solanum* spp. en charolas de unicel, utilizando turba de peatano (peat moost) como sustrato (Figura 4.C.), no se le aplico ningún tratamiento químico (ni a la semilla ni al sustrato), la siembra se realizo el 18 de Mayo de 2006.

Posteriormente cuando las plántulas tenían 10cm de altura, se realizo el transplante al campo el 20 de Julio de 2006. Se sembraron 15 plantas por surco (Fig. 4 .D,E,F).

Se realizó un deshierbe manual (Fig. 4 .H.), el 19 de Agosto 2006.

Se realizaron 3 muestreos tomando aproximadamente 30g de hojas al azar de cada especie silvestre sobreviviente de *Solanum* para el análisis enzimático: Primer muestreo, 18 de agosto de 2006; Segundo muestreo, 30 de agosto de 2006; Tercer muestreo, 27 de septiembre de 2006.

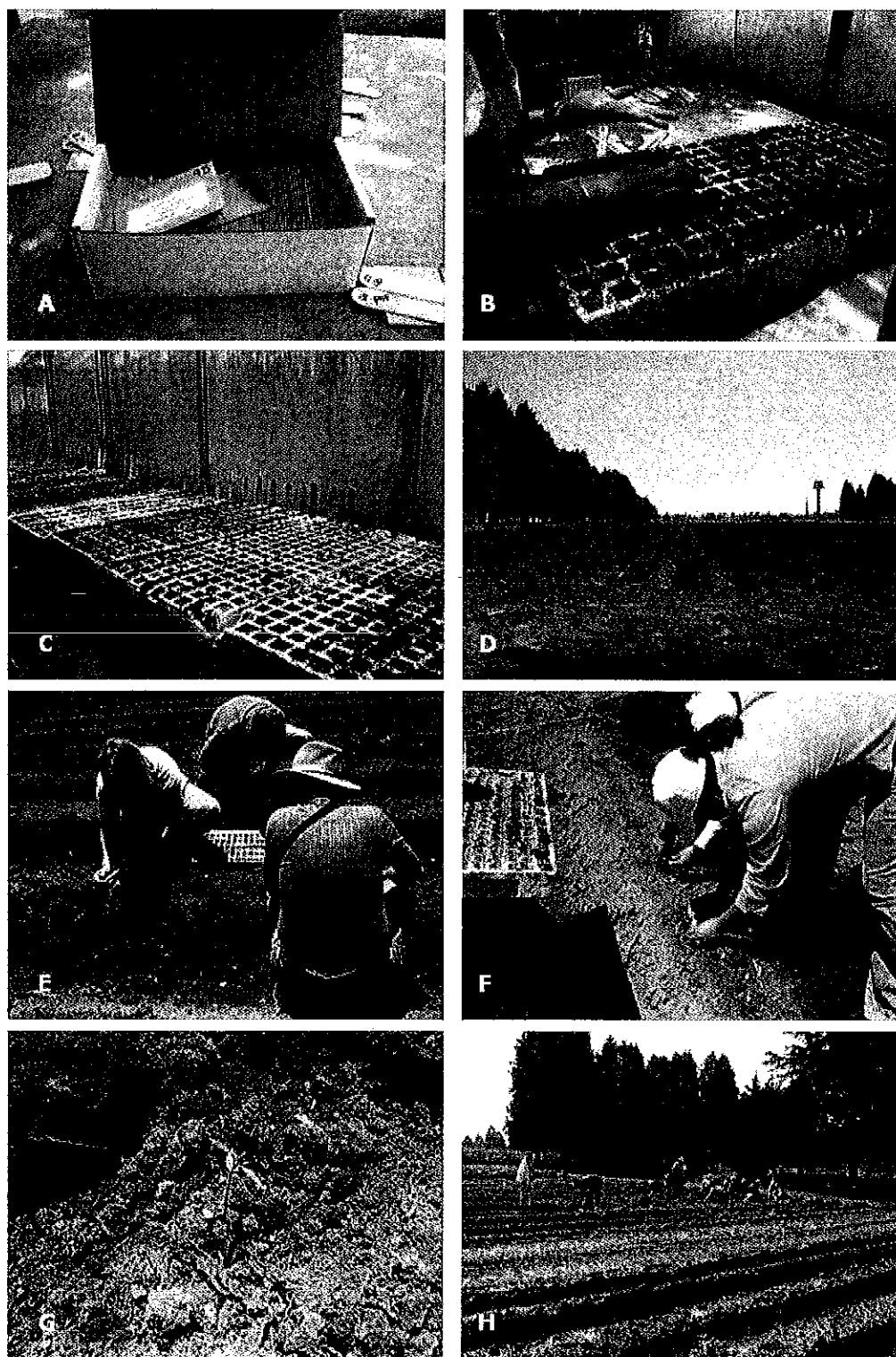


Figura 4. Siembra en invernadero y en campo de las especies silvestres de *Solanum* spp. A) Sobres con semillas de especies silvestres de *Solanum*; B) Siembra de semillas de especies silvestres de *Solanum*; C) Charolas en el invernadero; D) campo utilizado para el transplante de especies silvestres de *Solanum*; E y F) Transplante de especies silvestres de *Solanum*; G. *Solanum demisum* recién plantada y H) Deshierbe manual el 19 de Agosto de 2006

4.5.2. Fenoles totales

Se determino de acuerdo al método de Folin y Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994). Se utilizaron 30 μ del sobrenadante se aforo a 1ml con agua desionizada y 1ml de Folin-Ciocalteu con 2ml de carbonato de sodio al 20%; se agito, dejándose reposar por 2hr en obscuridad total; se leyo la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy). La cuatificación se realizó mediante una curva patrón de ácido tánico (Apéndice 3) y la concentración de fenoles totales se reporto en mg fenoles totales g⁻¹ peso fresco de tejido.

NOTA: En algunos casos se utilizo 60 μ o 90 μ de sobrenadante, dependiendo de la concentración y se adecuaron los demás reactivos a este.

Se realizo una curva estándar de ácido tánico de acuerdo con lo descrito por AOAC (1995), para la cuantificación.

Se disolvieron 10 mg de ácido tánico en 10 ml de agua desionizada, tomándose 2 ml y se aforó a 100 ml, y se obtuvo una concentración de 20 μ g/ml. Se tomaron alícuotas de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ml y se depositaron en tubos de ensayo. En seguida se le adicionó a cada tubo agua desionizada en el mismo orden 16, 15.5, 15, 14.5, 14, 13.5, 13 y 12.5 ml. Finalmente se le agrego 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu más 2 ml de solución de Na₂CO₃ al 20%. Se obtuvo un volumen total de 20 ml en cada tubo. Se mezcló perfectamente y se dejo reposar en la oscuridad durante 2 h y se registro la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro.

4.5.3. Fenilalanina amonio-liasas (EC4.3.1.5 PAL)

Su actividad se determinó con el método descrito por Martínez-Téllez y Lafuente (1997). Se utilizó 0.025g de polvo de acetona homogenizando por 50s, con 5ml de borato de sodio 0.1 M, pH 8.8, frío con β -mercaptoetanol y 1% de PVP. Se agitó la mezcla por 20min en baño con hielo (4°C), en seguida se filtró en un embudo de plástico con manta de cielo, centrifugándose por 30 min a 16,000 Xg a 4°C durante 20 min. Se extrajo el sobrenadante, la enzima se precipitó agregando 0.46g de sulfato de amonio por ml de sobrenadante y se agitó 30 min a 4°C. Se centrifugó 20 min a 12,500 Xg y 4°C; se conservó el precipitado y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se redisolvió agregando 5 ml de borato de sodio 0.1M, pH 8.8 y 0.9 ml de extracto final, preincubado a 40°C por min; se agregó 0.3 ml de L-fenilalanina 100nM y se midió la absorbancia a 290 nm. Simultáneamente se hizo el ensayo de una repetición de la muestra con 2.1ml de borato de sodio 0.1M, pH 8.8 y 0.9 ml del extracto final. Se evaluó el cambio de absorbancia en 2 h a 290nm a luz ultravioleta, manteniendo la muestra en baño maría a 40°C. La actividad enzimática se reportó como U/g de peso fresco donde $U = \Delta$ (absorbancia) a 290 nm h^{-1} .

4.5.4. Peroxidasa (EC1.11.1.7 POX)

El método utilizado fue el de Alia-Tejacal *et al.* (2002). Primero se extrajo la enzima con 0.025g de polvo de acetona. Se homogeneizó por 50s con 5ml de Tris-HCl frío, pH 7.1 y con 1% de polivinilpirrolidona (PVP) y se centrifugó por 20min a 30,000 Xg a 4°C. Utilizando el sobrenadante de acuerdo con Flurkey y Jen (1978). Con un volumen total de 3ml, 2.6ml de amortiguador Tris-HCl y pH 7.1, 0.25ml de guaiacol 0.1 M, 0.1 ml de

peróxido de hidrógeno 0.25% y 30 μ del sobrenadante. Se tomaron lecturas de absorbancia a los 30, 60, 120 y 180 segundos a 470 nm. La actividad enzimática se reportó como Ug de peso fresco (U es la unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol min⁻¹ de tetraguayacol).

4.5.5. Superóxido dismutasa (1.15.1.1 SOD)

El método utilizado fue el descrito por Beyer y Fridovich (1987). Se tomaron 0.025 g de polvo de acetona con 5 ml de fosfato, pH 7.8, frío, se homogenizo por 50s en frío. Posteriormente se centrifugó a 12,500 Xg por 20 min a 4°C, se dejo que tomaran temperatura ambiente en absoluta obscuridad. En tubos de rosca se agregaron 3ml de la solución preparada con buffer fosfatos + EDTA + metionina + NBT y Triton X y 0.5 ml de sobrenadante y se agitó. Posteriormente se le agregó 0.03 ml de riboflavina y se agitó vigorosamente. Para el testigo se siguió el mismo procedimiento exceptuando la rivo flavina. Se llevaron al cuarto oscuro con luz fluorescente (4 lámparas Osmar marca Red Slimline 75 W, luz de día hecho en México) durante 7 min. Se evaluó cambio de absorbancia a 560 nm. La actividad enzimática se reporta en unidades internacionales por gramo de peso fresco (U g⁻¹ pf), cada unidad es igual a la cantidad del sobrenadante que fotoinhíbe la formación de 50% de azul de nitro tetrazolium formazan.

4.5.6. Análisis de resultados.

El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante los programas NCSS (Number Crunching Statistical System) y Excel. Se aplicaron análisis de correlación y se elaboraron gráficas de comportamiento de las diferentes variables evaluadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la primera etapa de CAMPO, germinaron 15 plántulas de las siguientes especies silvestres de *Solanum* spp.

<i>S. berthaultii</i> ,	<i>S. pinnatisectum</i> ,
<i>S. bulbocastanum</i> ,	<i>S. polyadenium</i> ,
<i>S. deemisum</i> ,	<i>S. stenophyllidium</i> ,
<i>S. gourlayi</i> subs. <i>gourlayi</i> ,	<i>S. stoloniferum</i> ,
<i>S. hougasii</i> ,	<i>S. trifidum</i> .
<i>S. iopetalum</i> ,	<i>S. tuberosum</i> .
<i>S. microdontum</i> ,	<i>S. x sucrense</i> .

De las cuales después del trasplante en las instalaciones de PICTIPAPA solamente lograron sobrevivir: *S. demissum* (Apendice 2.A.), *S. tuberosum* (Apendice 2.B.), *S. microdontum* (Apendice 2.D.) y *S. pinnatisectum* (Apendice 2.C.).

5.1. Porcentaje de infección.

Se realizaron ocho muestreos, solamente de la especie *S. tuberosum* que fue la única que presentó síntomas de infección por el ataque de *P. infestans*, por ello solamente se presenta la curva infección de tal especie (Fig. 5).

Las evaluaciones anteriores demuestran que *S. tuberosum* variedad Alpha, ha presentado los porcentajes de infección más altos en el Valle de Toluca (Lozoya *et al.*, 1987; Lozoya y Hernández, 2001; Hinojosa, 2004 y Lozoya *et al.*, 2007), lo que

demuestra que es una especie susceptible, por ello solamente se obtuvieron datos de 2 muestreos ya que al tercero ya había muerto y las especies resistentes (*S. pinnatisectum*, *S. demissum* y *S. microdontum*), no presentaron síntomas de infección por el oomycete.

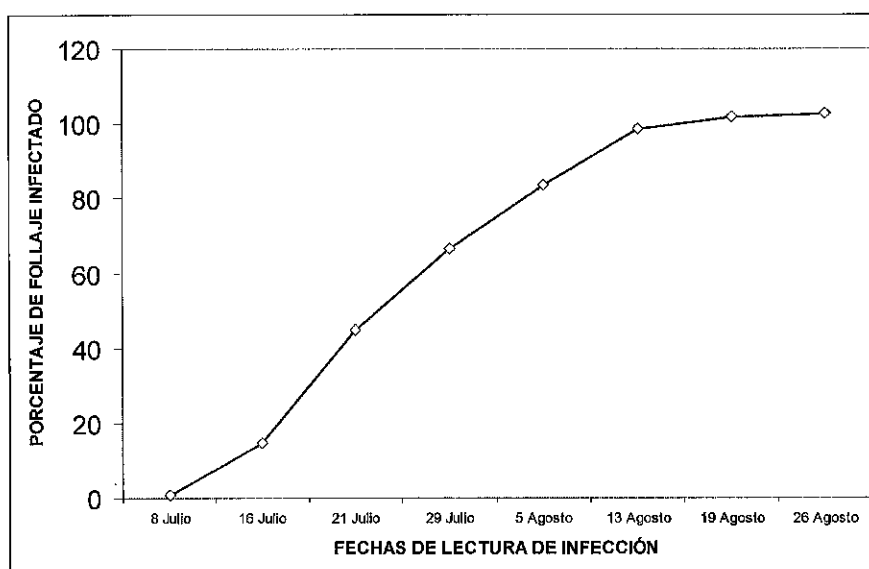


Figura 5. Curva de infección de *S. tuberosum*, variedad Alpha, en el 2006.

5.1. Fenoles totales.

Se observó un incremento en los fenoles totales a medida que se establecían las razas de *P. infestans* (Calderon, 2008). Se ha observado que algunos compuestos fenólicos tóxicos para los patógenos se generan en mayor cantidad cuando ocurre la infección o inhiben la producción de enzimas fúngicas e inactivan la producción enzimática del patógeno, como una respuesta de defensa de la planta (Agrios, 2004; Vidhyasekaran, 1997). Este aumento en los fenoles totales en estas especies silvestres de *Solanum* spp, se debe a que se activa una defensa pasiva contra el oomycete que ataca la planta, los

fenoles se acumulan a través de la ruta de los fenilpropanoides activándose la PAL (Basha *et al.*, 2006).

Este comportamiento se observa (Fig. 6) en las especies silvestres *S. demissum*, *S. pinnatisectum*, *S. microdontum*.

S. tuberosum tuvo un decremento en los fenoles totales que concuerda con las enzimas analizadas anteriormente, esto debido a que es susceptible a la infección del oomiceto y no logra mantenerse hasta el tercer muestreo.

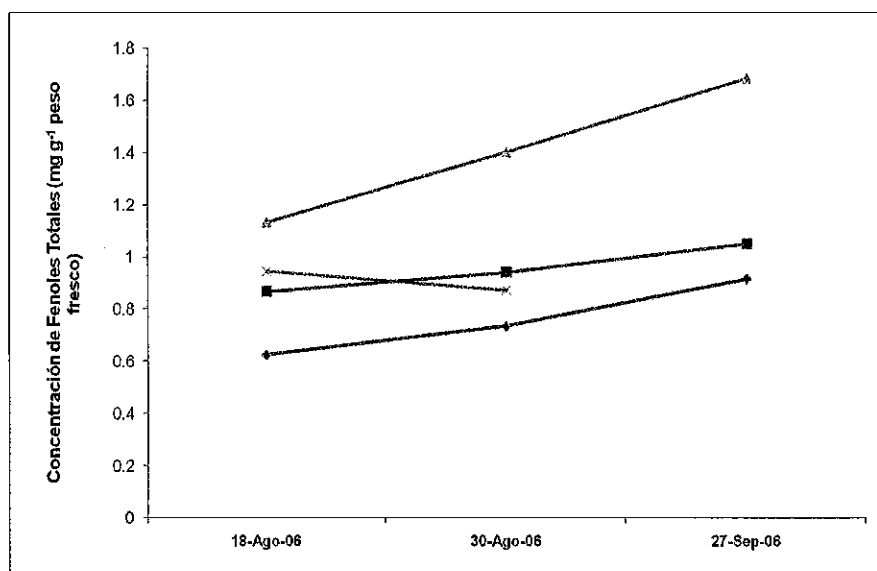


Figura 6. Concentración de fenoles totales de las especies silvestres de *Solanum* spp. $\blacktriangle$ *S. pinnatisectum*, $\blacksquare$ *S. demissum*, $\times$ *S. tuberosum* y $\blacklozenge$ *S. microdontum*

5.2. Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)

Las especies silvestres de *Solanum* spp tuvieron un incremento en la actividad de esta enzima a medida que el patógenos se presentaba en campo (Calderon, 2008), por lo tanto las planta *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. microdontum*, reconocieron al oomycete provocando la expresión de genes de defensa ante al ataque (Fig. 7).

S. tuberosum, registró una disminución en la actividad de PAL, ya que en el tercer muestreo se habían muerto todas las plantas. La disminución de la actividad de PAL se debe a que el hospedero es susceptible (Vidhayasekara, 1997).

Según Bobey (1989), la actividad de la PAL aumenta cuando la planta es sometida a diferentes situaciones de estrés y ataque de patógenos, de la misma manera Azcon y Talon (1993) aseguran que se debe a que los genes responsables de la síntesis de la enzima pueden responder a la presencia de elicitores biológicos. Sin embargo Jone (1984) asegura que la PAL se presenta en todos los estadios del crecimiento.

Por lo tanto tomando en cuenta que la presencia de todas las razas del oomiceto ya se encontraban en el Valle de Toluca (Calderon, 2008).

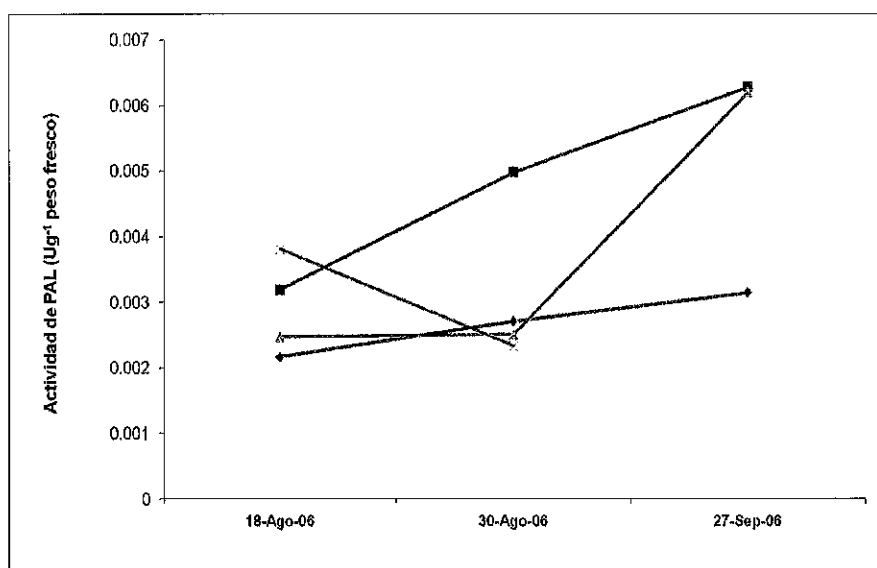


Figura 7. Actividad de PAL en especies silvestres de *Solanum* spp. —▲— *S. pinnatisectum*, —■— *S. demissum*, —×— *S. tuberosum* y —◆— *S. microdontum*

5.3. Peroxidasas (EC1.11.1.7 POX)

Se observa un incremento del primer al tercer muestreo en la actividad de las especies silvestres de *Solanum*, *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. microdontum* (Fig. 8) a medida que las condiciones ambientales (Apéndice 3) permiten el establecimiento de todas las razas de *P. infestans* se incrementa (Calderon, 2008). Este incremento proporciona lignificación de la pared celular y follaje para que el patógeno no se establezca en la planta (Goodman, *et al.*, 1986).

En el caso de *S. tuberosum*, a medida que las condiciones ambientales favorecían a la enfermedad y el oomycete se incrementaba (Calderon, 2008), fue disminuyendo la actividad de la enzima, lo cual sugiere que no es resistente y van bajando sus reacciones de defensa hasta la muerte. Tomando en cuenta que el inicio del proceso oxidativo es la primera acción que desencadena los mecanismos de defensa de la planta donde el O_2^- es generado por diversas rutas y el NADH/NADP⁺ es oxidado a NAD/NAD⁺ en presencia de peroxidasa, cuando el O_2^- sufre una reducción hay una catalización específica en la membrana por fosforilación de NAD(P)H oxidasa que cataliza la reducción del oxígeno molecular, dando como resultado la muerte del patógeno (Mehdy, 1994).

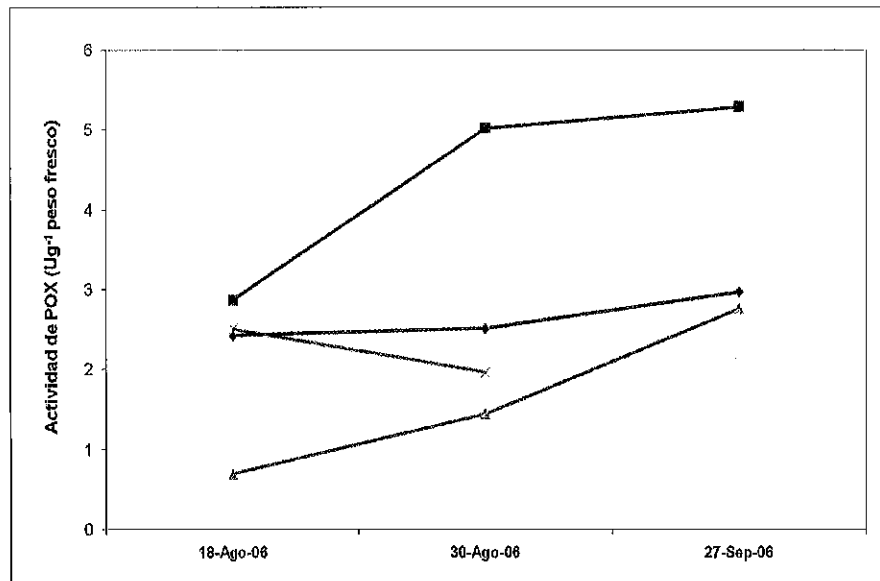


Figura 8. Actividad de POX en especies silvestres de *Solanum* spp. —Δ— *S. pinnatisectum*, —■— *S. demissum*, —×— *S. tuberosum* y —◆— *S. microdontum*

5.4. Superoxido dismutasa (1.15.1.1 SOD)

Las especies silvestres de *Solanum* mostraron un incremento en la actividad enzimática de la SOD (Fig. 9) como consecuencia del contacto que surgió del elicitador del patógeno con la planta, activando las reacciones de defensa de la SOD, que proporciona protección a las células de la toxicidad del O_2^- y transformarlo en H_2O_2 y la síntesis de las especies de oxígeno actúan directamente contra el patógeno (Vidhyassekaran, 1997). Gutiérrez (2006), señala que después de la adición del patógeno se presentara la expresión de genes de avirulencia en la interacción planta-patógeno y la expresión del grupo de genes *Hrp* o genes HR. Vidhyassekaran (1997) también menciona que la POX en combinación con la SOD minimizan la acción toxica de las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS).

Por ello se observó que en las especies silvestres resistentes (*S. demissum*, *S. pinnatisectum*, *S. microdontum*) se incremento la actividad al avanzar en los muestreos. Con *S. tuberosum* fue lo contrario, ya que la actividad de SOD disminuyo.

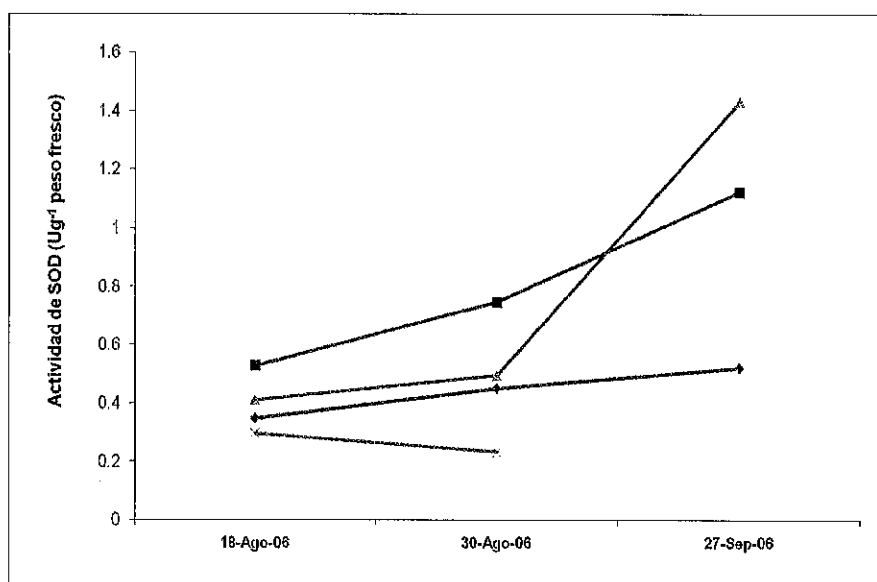


Figura 9 Actividad de SOD en especies silvestres de *Solanum* spp. —▲— *S. pinnatisectum*, —■— *S. demissum*, —×— *S. tuberosum* y —◆— *S. microdontum*

La supervivencia de los organismos depende de las interacciones de sus genomas con el medio ambiente en el que viven. Por ello observamos que las especies silvestres de *Solanum*, mostraron un incremento en la actividad de enzimas PAL, POX, SOD y fenoles totales a medida que se presentaban las razas *P. infestans* (Calderon, 2008).

S. demissum es la que presento mayor actividad de las enzimas como reacción de defensa, como esta reportado en la literatura es resistente a *P. infestans* y a diversas a condiciones ambientales adversas (Ligarreto, 2001). *S. pinnatisectum*, presento una actividad similar a *S. demissum*, resistente aunque no es muy utilizada. *S. microdontum*, con menor actividad pero resistente. Finalmente *S. tuberosum*, resistió el ataque de

algunas razas, pero decayó cuando se presentaron todas hasta llegar a morir, por lo que la actividad iba decayendo, por lo tanto presento una resistencia parcial.

5.5. Análisis de correlación.

5.5.1. *Solanum microdontum*.

Se observaron correlaciones con un nivel de significancia $P=\alpha\leq 0.05$ entre fenoles totales/fenilalanina amonio-liasa ($r=0.934098$), peroxidasas/superóxido dismutasa ($r=0.974500$) y fenilalanina amonio-liasa/peroxidasas ($r=0.786853$). Por otro lado la correlación entre fenoles totales/peroxidasas ($r=0.881640$), fenoles totales/superóxido dismutasa ($r=0.769386$) y fenilalanina amonio-liasa/superóxido dismutasa ($r=0.786294$) fue alta pero fue no significativa (Cuadro 1).

Cuadro 1. Correlación de variables para *S. microdontum*

Variables	FEN	PAL	POX	SOD
FEN	1.00	0.934098*	0.881640 ^{NS}	0.769386 ^{NS}
PAL		1.00	0.786853*	0.786294 ^{NS}
POX			1.00	0.974500*
SOD				1.00

* Nivel de significancia $\alpha\leq 0.05$, NS-No Significancia, FEN-Fenoles totales, PAL-Fenilalanina amonio-liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido Dismutasa.

5.5.2. *Solanum demissum*

Para la especie *S. demissum* las correlaciones fueron significativas con una $P=\alpha\leq 0.05$ entre fenoles totales/fenilalanina amonio-liasa ($r=0.945933$) y peroxidasas/superóxido dismutasa ($r=0.876633$). Las correlaciones entre fenoles totales/peroxidasas ($r=0.881640$), fenoles totales/superóxido dismutasa ($r=0.769386$), fenilalanina amonio-

liasa/peroxidasas ($r=0.786853$) y fenilalanina amonio-liasa/superóxido dismutasa ($r=0.786294$) resultaron no significativas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Correlación de variables para *S. demissum*

Variables	FEN	PAL	POX	SOD
FEN	1.00	0.945933*	0.766914*	0.865232 ^{NS}
PAL		1.00	0.753345 ^{NS}	0.741276 ^{NS}
POX			1.00	0.876633*
SOD				1.00

* Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS-No Significancia, FEN-Fenoles totales, PAL-Fenilalanina amonio-liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa.

5.5.3. *Solanum pinnatisectum*

Las correlaciones fueron significativas un nivel de significancia $P=\alpha \leq 0.05$ entre fenoles totales/fenilalanina amonio-liasa ($r=0.810134$), peroxidasas/superóxido dismutasa ($r=0.889704$) y fenoles totales/peroxidasas ($r=0.95548$). Las correlaciones entre fenoles totales/superóxido dismutasa ($r=0.769386$), fenilalanina amonio-liasa/peroxidasas ($r=0.850427$) y fenilalanina amonio-liasa/superóxido dismutasa ($r=0.825007$) resultaron no significativas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Correlación de variables para *S. pinnatisectum*

Variables	FEN	PAL	POX	SOD
FEN	1.00	0.810134*	0.95548*	0.769386 ^{NS}
PAL		1.00	0.850427 ^{NS}	0.825007 ^{NS}
POX			1.00	0.889704*
SOD				1.00

* Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS-No Significancia, FEN-Fenoles totales, PAL-Fenilalanina amonio-liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa.

5.5.4. *Solanum tuberosum*

Las correlaciones tuvieron significancia estadística con una probabilidad de $P=\alpha \leq 0.05$ entre fenoles totales/fenilalanina amonio-liasa ($r=0.971282$), peroxidasas/superóxido

dismutasa ($r=0.929529$) y fenoles totales/peroxidadas ($r=0.933001$). Las correlaciones entre, fenoles totales/superóxido dismutasa ($r=0.682466$), fenilalanina amonio-liasa/peroxidadas ($r=0.792314$) y fenilalanina amonio-liasa/superóxido dismutasa ($r=0.63383$) resultaron no significativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Correlación entre variables de *S. tuberosum*

Variables	FEN	PAL	POX	SOD
FEN	1.00	0.971282*	0.933001*	0.682466 ^{NS}
PAL		1.00	0.792314 ^{NS}	0.63383 ^{NS}
POX			1.00	0.929529*
SOD				1.00

Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS-No Significancia, FEN-Fenoles totales, PAL-Fenilalanina amonio-liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa.

Se observó una correlación directa y significativa para todas las especies silvestres (*S. microdontum*, *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. tuberosum*) entre la actividad de fenilalanina amonio-liasa y la concentración de fenoles totales, esto debido a que la fenilalanina amonio-liasa regularmente exhibe mayor actividad o síntesis de *nov* en los tejidos enfermos o en genotipos resistentes, y es precursora de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Dixon y Harrison, 1991).

En al igual que la correlación anterior para el caso de peroxidasa y superóxido dismutasa resultó ser altamente correlacionada y estadísticamente significativa para todas las especies silvestres, ya que la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ y lo convierte en peróxido de hidrógeno, se encuentra en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias de las plantas. Las peroxidadas, que utilizan el peróxido de hidrógeno durante las reacciones de lignificación y la enzima ascorbato peroxidasa localizada en los cloroplastos y en el citoplasma, eliminan el

peróxido de hidrógeno utilizando ácido ascórbico para convertirlo en agua, durante los mecanismos de defensa de la planta ante un patógeno (García *et al.*, 2004).

En el caso de la correlación entre fenoles totales y peroxidasas se presentó una alta correlación con significancia para *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. tuberosum*. La peroxidasa oxida los compuestos fenólicos y aumenta la velocidad de polimerización de esos compuestos en sustancias similares a la lignina que se depositan en las paredes y papilas celulares e interfieren con el posterior crecimiento y desarrollo del patógeno (Agrios, 2001).

Las correlaciones de las especies silvestres incluidas en este estudio para fenoles totales/superoxido dismutasa y fenilalanina amonio-liasa, resultaron positivas pero no tienen significancia estadística. Sin embargo para el caso de *S. microdontum* resultó positiva la correlación de fenilalanina amonio-liasa /peroxidasas con significancia estadística y positiva pero sin significancia para fenoles totales /peroxidasas.

6. CONCLUSIONES

La respuesta en la presencia y actividad de las enzimas de defensa incluidas en el presente estudio estuvo relacionada directamente a la resistencia del hospedante contra el patógeno (las especies resistentes activaron sus mecanismos mas pronto y con mas intensidad que la especie susceptible).

La acción simultánea de varios mecanismos de defensa (fenoles totales, fenilalanina amonio-liasa, peroxidasas y superóxido dismutasa) demuestra el carácter poligénico de la resistencia genética de las especies que así lo demostraron en el presente estudio.

7. LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. 2001. Fitopatología. Editorial UTEHA. Noriega Editores Segunda Edición. México, D.F. pp. 98-117
- Alia-Tejacal I., M.T. Martínez- Damián y M.R. Soto-Hernández. 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.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. Vol. II. Food Chemistry 34:823-826.
- Azcon, B.J. and M. Talon. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana Mc.Graw-Hill. pp: 237-2250.
- Basha, S.A., B.K., Sarma, D.P. Singh, K Annapurna., and U.P. Singh. 2006. Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase and phenolic compounds differentially in Chickpea. Folia Microbiol. 51:463-468.
- Beyer, F. W., I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analyt. Biochem. 161:559-566.
- Bobey R., M.Baggiolini. 1989. La defensa de las plantas cultivadas. Tratado práctico de fitopatología y zoología agrícola. Segunda Edición. Ediciones Omega. pp 897.

- Buchanan B. B, W. Gruissen, R.L. Jones. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. EE.UU. ISBN: 0943088399
- Calderon, M.N.D. 2008. Algunas reacciones de defensa en diferenciales de *Solanum* spp. para razas de *Phytophthora infestans* (Mont) D. Bary. Tesis de Maestría en Protección Vegetal. En Proceso.
- Camarena, G.G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, Vol.12, número 001. pp. 25-30
- Cañizares, C.A. and G. A. Forbes. 1995. Foliage resistance to *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in the Ecuadorian national collection of *Solanum phureja* ssp. *phureja* Juz. and Buk. Potato Res. 38:3-10.
- Colon, L. T.C. Jasen, and D. J. Budding. 1995. Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrid progenies of four South American *Solanum* species crossed with diploid *S. tuberosum* Theor Appl Genet 90: 691-698.
- Colon, T.L., D.J. Budding, L.C.P. Keizer, and M.M.J. Pieters. 1995. Components of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in eight South American *Solanum* species. Eur. Jour. Plant Pathol. 101:441-456.
- Corne, M.J. P., J.G.M. Pierre, P.M. De Wit and G. Francine 1992. Molecular aspects of the potato- *Phytophthora infestans* interaction. Neth, J. PI path. Vol. 98. Suplemento

- Cornide M.T., H. Lima y A. Sigorra. 1985. Genética Vegetal y Fitomejoramiento. Ed. Científico-técnica. Ciudad de la habana. pp: 411-414.
- Cummins, J. 2006. Genes de la planta Silvestre *Solanum bulbocastanum*, usados para resistir al hongo del tizón tardío de la papa. Red por una América latina libre de transgénicos- boletín 195
- Dixon, R.A. and M. J. Harrison. 1991. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants, Adv. Genet. 28:166-234.
- Estrada R.N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CIP-IPGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA-COSUDE-CID. Edición de Ardí, B y Martínez, E. Impreso en Bolivia. 372p.
- Flores, C.R. 1969. Taxonomía, distribución y potencial de los *Solanum* tuberíferos silvestres de México. Inst. Nal de Investigaciones Agrícolas, SAG, México. 33 p.
- Flurkey, W.H. and J.J. Jen. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. J. of Food Sci. 43:1828-1831.
- García, P.E., C.A. Arreola y M.E. Castro. 2004. Oxígeno herramienta para fabricar Defensas Bioquímicas en la planta del chile. Ciencia y desarrollo (CONACYT). [Publicación en línea] Disponible en Internet <<http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/177/articulos/pdf/oxigeno.pdf>>.
- [Fecha de acceso: 05 de febrero, 2008].

- Goodman, N.R., Z. Kirán, and K.R. Wood. 1986. The biochemistry and physiology of de plant disease. University of Missouri Press. Columbia. 268 p.
- Goodwin, S.B, B.A. Cohen, and W.E. Fry. 1994. Panglobal distriburion of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc Natl Acad Sci* 91:11591-11595.
- Goodwin, S.B. 1996. Origin and Ecology of *Phytophthora infestans*. *Rev Mex Fitopatología* 14:143-147.
- Grünwald, N.J., W.G. Flier, A.K. Sturbaum, S.E. Garay, T.B.M. Van de Bosch, C.D. Smart, J.M. Matuszak, S.H. Lozoya, L.J. Turkensteen and W.E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central. *Phytopathology*. 91:882-890.
- Gutiérrez, G. C. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo. Serie de Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12:25-30.
- Guzman-N, J. 1964. Nature of partial resistance of certain clone of three *Solanum* species to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 54:1398-1404.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jones. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plan Cell*. 8:1773-1791.
- Hawkes, J.G.1994. Origins of cultivated potatoes and species relationship. *In: Potato Genetics*. Bradshaw, J.E., and G.R. Mackay. Cab International. U.K. pp: 3-42.

- Henfling, J.W. 1987. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Segunda edición. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú (Boletín de Información Técnica No. 4). 25 p.
- Hinojosa, R.R. 2004. Defensa química en clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont De Bary). Tesis de Maestría en Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp 70.
- Huang, A. H.C., R.N. Trelease and T.S. Moore Jr. 1983. Plant Peroxisomes. Ed. Academic Press. New York London. pp: 151.
- Jankiewicz L.S. y P. Sobiczewski. 2003. Las fitoalexinas y otras sustancias relacionadas con la resistencia de las plantas a los patógenos. In: L.S. Jankiewicz (ed.). Reguladores del Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Volumen I Propiedades de acción. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 427-464
- Jones, D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry* 23:1349-1359.
- Kim, M.C., R. Panstruga, C. Elliott, J. Muller y A. Devoto. 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 52:416-417.
- Kolovayev, V.A. 2002. Donors of Potato Horizontal Resistance to *Phytophthora infestans*. GILB'02 CONFERENCE: late blight managing the global threat. ABSTRACS. 11-13 July. Hamburg. Germany.

- Latin, R. X., D.R. Mackenzie and H. Cole. 1981. The influence of host and pathogen genotypes on the apparent infection rates of potato late blight epidemics. *Phytopathology* 71:82-85.
- Ligarreto M, G.A. 2001. Los Recursos Genéticos: Un acervo importante para el mejoramiento de la producción de Papa. Corpoica: Innovación y Cambio Tecnológico. Vol. 2, Número 1. Colombia. pp 12-17.
- Lozoya Saldaña H., y Hernandez-Vilchis. 2001 Compuestos registrados y de la seccion 18 para el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) en papa en Toluca, México. *Agrociencia* 35: 451-458.
- Lozoya Saldaña, H., O Barrios, and J. Bamberg. 2005 *Phytophthora infestans*; Races vs genotypes in the Toluca Valley, México. Potato Association of América 89th Annual Meeting, Calgary, Alberta, Canada.
- Lozoya-Salaña, H, R.R. Hinojosa y M.T.L. Colinas. 2007. Fenoles, Peroxidasa y Fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont, De Bary), *Agrociencias*, Vol. 41. No. 4. pp. 478-489.
- Lozoya-Saldaña H., A. Hernández, R. Flores and J. Bamberg. 1997. Late Blight on wild *Solanum* species in the Toluca Valley in 1996. In: Eighty-first Annual Meeting of The Potato Association of America, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. Abstract 92.

- Lozoya-Saldaña, H., L. Guzmán-Galindo, S. Fernández-Pavía, N.J. Grünwald, and E. McElhinny. 2006 *Phytophthora infestans* Mont. De Bary. I. Host-pathogen specificity and resistance components. *Agrociencia* 40: 205-217.
- Lucas, G.B., L.T. Campbell. 1985. Introduction to plant diseases, identification and management. AVI: Westport, Conn. Pp. 51-53.
- Luján, C.L., 1996. Historia de la papa. *Revista Papa. Órgano Informativo de la Federación Colombiana de Productores de Papa, FEDEPAPA*. No. 16, Diciembre.
- Martínez-Téllez M. A. and M.T. Lafuente. 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chieftain fortune mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150:674-678.
- Medhy, M., C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*. 105:467-472.
- Niederhaser, J.S. 1962. Evaluation of multigenic "field resistance" of the potato to *Phytophthora infestans* in 10 years of trial at Toluca, México. *Phytopathology*, pp 52:746.
- Palazón, J.R., M. Cusidó y C. Morales 2005. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. 6 p.

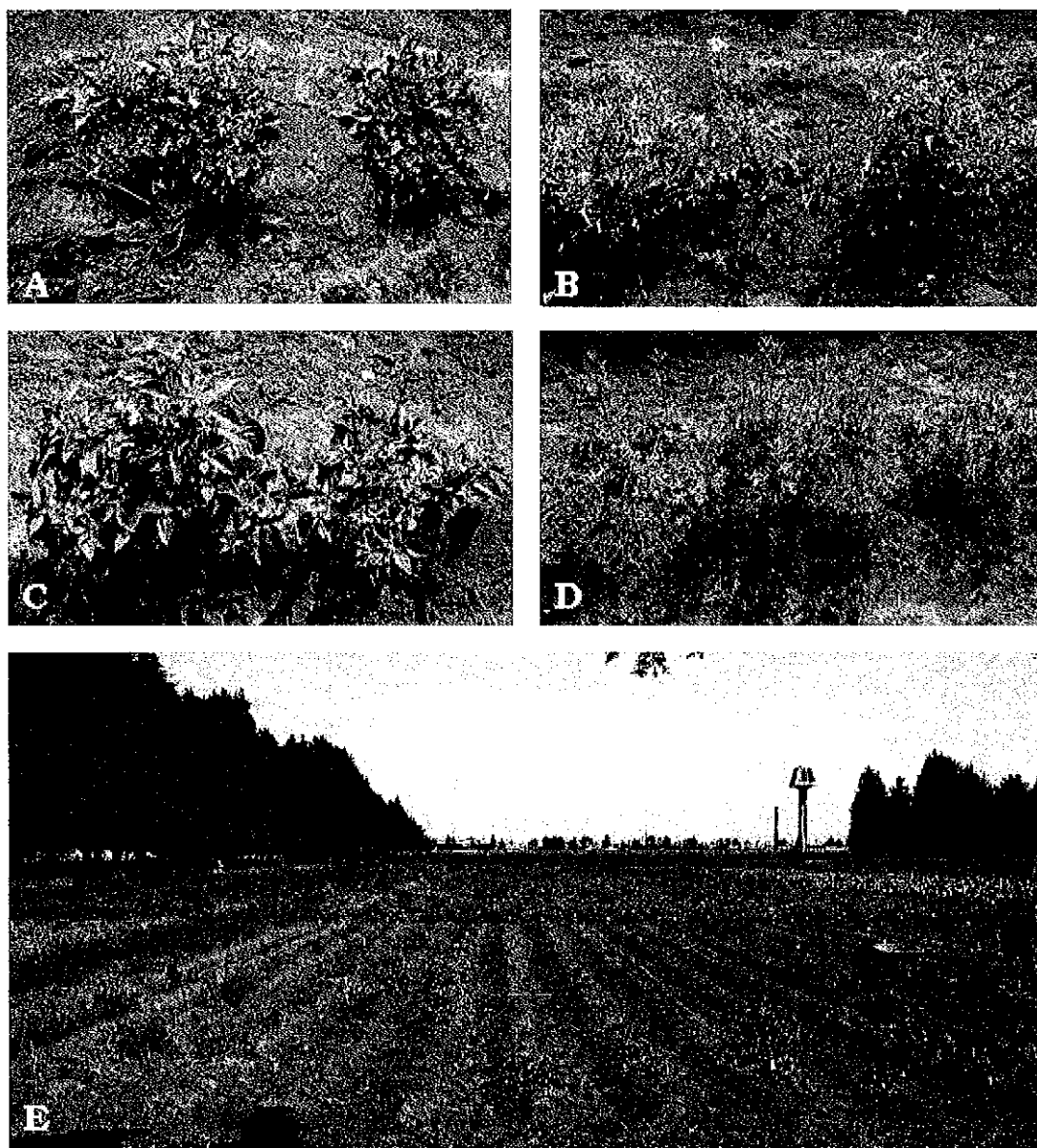
8. APÉNDICES

Apéndice 1. Clave de campo para evaluar el progreso de la enfermedad causada por *Phytophthora infestans* en la papa.

Valores escala del CIP	Tizón (%)		
	Media	Limites	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 esta 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 esta destruida.
6	75	65<85	La parcela luce verde con manchas pardas. Alrededor del 75% de cada planta esta afectada. Las hojas de mitad inferior de las plantas están destruidas.
7	90	85<95	La parcela no está predominante verde ni parda. Solo 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.

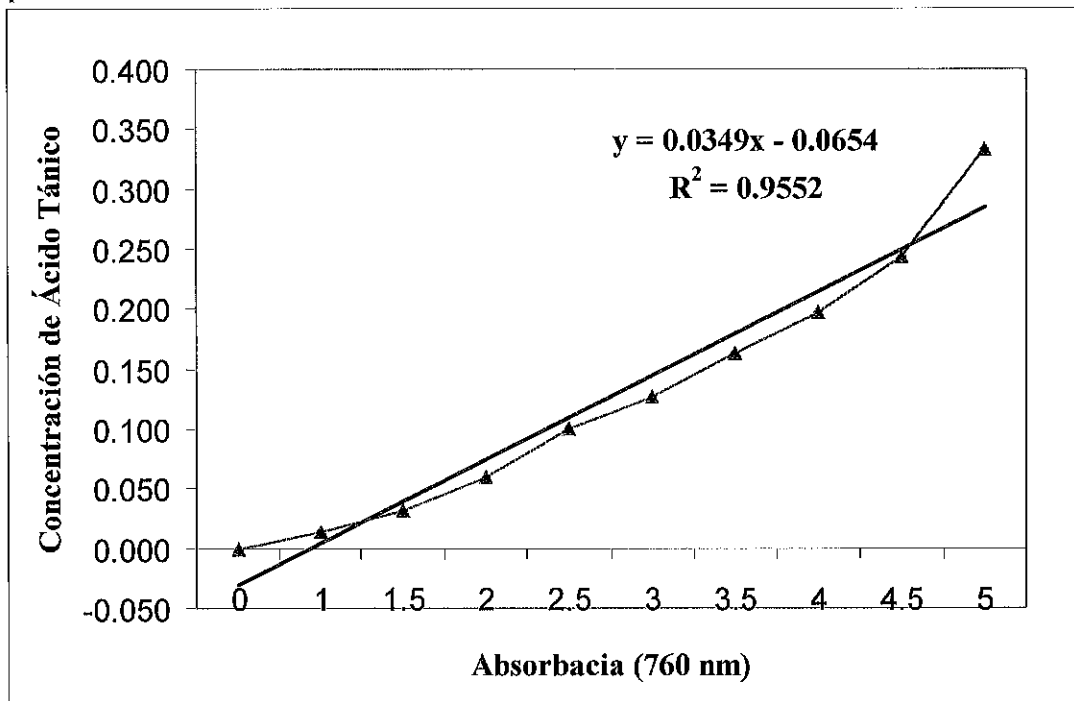
La descripción de síntomas se basa en plantas con 4 tallos y de 10 a 12 hojas por tallo (Henfling, J.W. 1987)

Apéndice 2. Especies Silvestres de *Solanum* spp, 30 de agosto de 2006

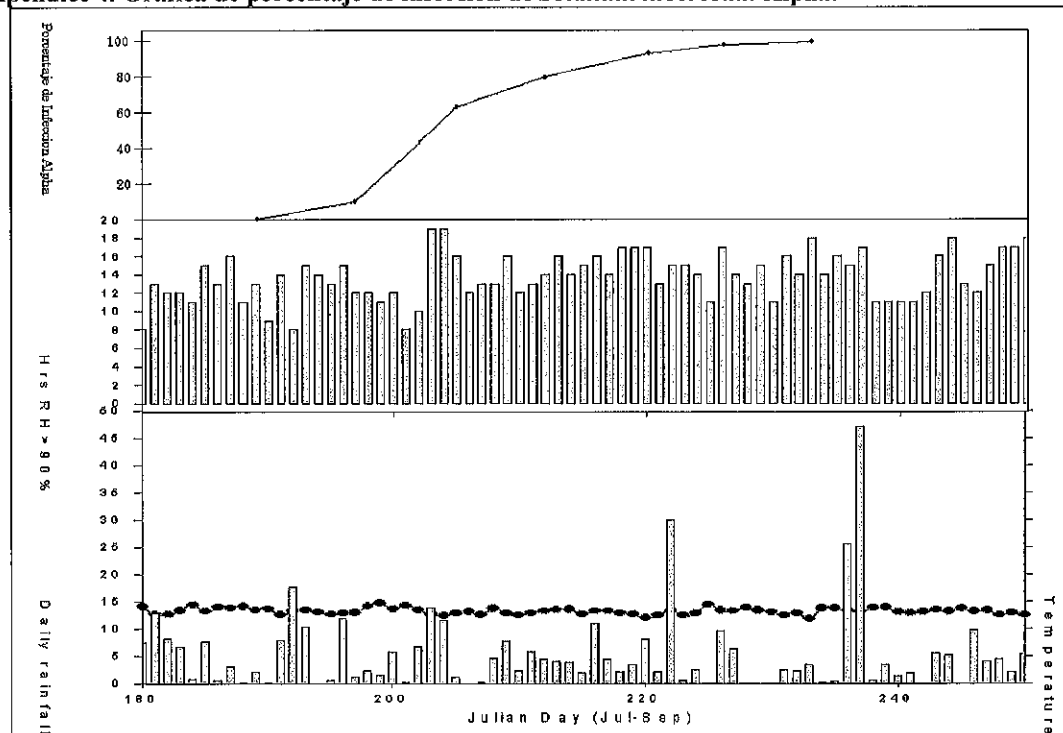


A) *Solanum demissum*, B) *Solanum tuberosum*, C) *Solanum microdontum*, D) *Solanum pinnatisectum* y E) Campo con especies silvestres de papa

Apéndice 3. Curva de Ácido Tánico



Apéndice 4. Gráfica de porcentaje de infección de *Solanum tuberosum* Alpha.



Horas de Humedad Relativa (HR) mayor a 90%, días de lluvia y temperatura, en el Valle de Toluca en 2006.