



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



**Enzimas de resistencia en especies silvestres de
Solanum spp.**

TESIS



**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



Presenta

José Luis Hernández Corral

Bajo la supervisión de: Héctor Lozoya Saldaña, Ph.D.

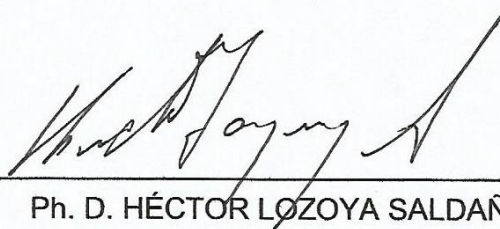
Chapingo Estado de México, marzo de 2020

Enzimas de resistencia en especies silvestres de *Solanum* spp.

Tesis realizada por **JOSÉ LUIS HERNÁNDEZ CORRAL** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Director:



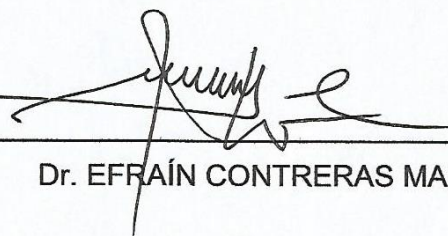
Ph. D. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

Asesor:



Ph. D. Ma. TERESA BERYL COLINAS Y LEÓN

Asesor:



Dr. EFRAÍN CONTRERAS MAGAÑA

CONTENIDO

Cuadros	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE APÉNDICES	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
DATOS BIOGRÁFICOS	viii
1. Introducción general	1
2. Revisión de literatura	4
2.1 Tizón tardío de la papa: <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary.	4
2.1.2 Origen.....	4
2.1.3 Ciclo de vida.....	5
2.1.4 Reproducción sexual y asexual	6
2.1.5 Síntomas	7
2.2 Mecanismos de defensa de las plantas a nivel celular	8
2.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxigene Species, ROS) ...	9
2.3. Superóxido Dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1).....	11
2.4. Peroxidasa (POD, EC. 1.11.1.7).....	12
2.5. Catalasa (CAT, EC. 1.11.1.6)	14
2.6. Polifenol oxidasa (PPO, EC. 1.14.18.1).....	15
2.7. Compuestos fenólicos	16
2.8. Fenilalanina Amonio-liasa (PAL, EC. 4.3.1.5).....	18
2.9. Ácido salicílico (AS)	19
2.10. Relación entre enzimas	21
2.10.1. Relación SOD, CAT, POX y PPO.....	21
2.10.2. Relación entre PAL, FEN y AS	24
2.11. Antecedentes del VIR	28
2.12. Literatura citada.....	29
ENZIMAS DE RESISTENCIA CONTRA EL TIZÓN TARDÍO (<i>Phytophthora infestans</i> Mont. De Bary) EN ESPECIES SILVESTRES DE <i>Solanum</i> spp	52
Resumen.....	52
Abstract.....	53
Introducción	53

Materiales y métodos	55
Resultados y discusión	58
Severidad de infección	58
Superóxido dismutasa	60
Catalasa	60
Peroxidasa.....	60
Polifenol oxidasa.....	61
Fenoles totales	62
Fenilalanina amonioliasa	62
Ácido salicílico	63
Análisis de correlación.....	63
Conclusiones	65
Literatura citada	66
Apéndices	72
Comparación de medias.....	72
Análisis de varianza	76
Correlaciones	83

CUADROS

Cuadro 1. Correlaciones significativas infección/metabolitos.....	63
Cuadro 2. Correlaciones significativas entre metabolitos por especie de <i>Solanum</i>	65
Cuadro 3. Comparación de medias para fenoles totales.	72
Cuadro 4. Comparación de medias para fenilalanina amonioliasa.	72
Cuadro 5. Comparación de medias para polifenol oxidasa.....	73
Cuadro 6. Comparación de medias para peroxidasa.	73
Cuadro 7. Comparación de medias para catalasa.	74
Cuadro 8. Comparación de medias para ácido salicílico.	74
Cuadro 9. Comparación de medias para superóxido dismutasa.....	75
Cuadro 10. Análisis de varianza para fenoles totales.	76
Cuadro 11. Análisis de varianza para fenilalanina amonioliasa.	77
Cuadro 12. Análisis de varianza para polifenol oxidasa.....	78
Cuadro 13. Análisis de varianza para peroxidasa.	79
Cuadro 14. Análisis de varianza para catalasa.	80
Cuadro 15. Análisis de varianza para para ácido salicílico.	81
Cuadro 16. Análisis de varianza para para superóxido dismutasa.	82
Cuadro 17. Coeficientes de correlación y nivel de significancia entre especies, enzimas y severidad de infección.	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida <i>Phytophthora infestans</i> (Agrios, 2005).	5
Figura 2. Síntomas de tizón tardío en hojas de papa.....	7
Figura 3. Clasificación de las peroxidasas (Pandey, et al., 2017).....	12
Figura 4. Representación esquemática de la ruta del ácido shikímico, ruta del ácido malónico y sus derivados (Cheynier, et al., 2013).....	17
Figura 5. PAL y sus derivados	18
Figura 6. Rutas de síntesis del ácido salicílico.....	20
Figura 7. "Effectors from Diverse Pathogens Indirectly Target a Master Regulator of SA Signaling, to Promote Disease Development".....	21
Figura 8. Respuestas de defensa de la planta (De Ascensao y Dubrey, 2003).25	

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices	72
Comparación de medias.....	72
Análisis de varianza	76
Correlaciones	83

AGRADECIMIENTOS

A Dios el creador del Todo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de estudios y a los profesores y funcionarios de la Universidad Autónoma Chapingo en especial al personal docente y administrativo del Instituto de Horticultura por su buena disposición para llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, a la Dra. Ma. Teresa B. Colinas y León, al Dr. Efraín Contreras Magaña, al I. Q. Cecilio Bautista, Karina y personal del campo del INIFAP. Ya que gracias a su apoyo incondicional además de su oportuna y eficaz participación fue posible solucionar los inconvenientes que se presentaron a lo largo de mi estadía en este posgrado. Infinito agradecimiento a ustedes por ser personas muy comprometidas con su labor.

A los compañeros y grandes amigos que me brindaron su apoyo en las distintas etapas de la experimentación: Monserrat, Guillermo, Alan, Armando, Artemio, Ulises.

A mis padres y hermanos que me apoyaron a lo largo de todos estos años.

Al pueblo de México

DATOS BIOGRÁFICOS

1. Datos personales

Nombre:	José Luis Hernández Corral
Fecha de nacimiento:	8 de agosto de 1994
Lugar de nacimiento:	Quiroga, Michoacán
No. Cartilla militar:	2109740
CURP:	HECL940808HMNRRS04
Cédula profesional:	10958688

2. Desarrollo académico

Bachillerato:	Colegio de Bachilleres del estado de Michoacán.
Licenciatura:	Agronomía en Horticultura Protegida, Chapingo, Méx.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La papa (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia de las Solanáceas su centro de origen se ubica en la región de las montañas andinas del sur de América. Existen cinco mil variedades de papa en el mundo de las cuales tres mil se han encontrado en Perú, Bolivia, Ecuador, Chile y Colombia (Hijmans y Spooner, 2001). Es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial, después del trigo, arroz y maíz (Ezekiel, *et al.*, 2013).

La principal enfermedad que ataca a este cultivo es el tizón tardío causada por el oomiceto *Phytophthora infestans*. En condiciones de humedad y temperaturas de 10 a 20 °C puede causar severos daños al desarrollo y rendimiento de la planta (Fry, 2008). Esta enfermedad puede afectar negativamente a este cultivo originando efectos devastadores como los ocurridos en la década de 1840 donde más de un millón de irlandeses murieron y cientos de miles migraron hacia los Estados Unidos y demás países europeos debido al daño que causó el tizón tardío a los cultivos de papa (Zadoks, 2008). En la actualidad esta enfermedad es considerada una amenaza ya que el patógeno produce estructuras de propagación asexual (esporangios y zoosporas) las cuales son fácilmente dispersadas por el viento y la lluvia, además de que la reproducción sexual de este oomiceto produce oosporas que pueden sobrevivir por largos periodos (Brylinska, *et al.*, 2016).

El número de cultivares utilizados en plantaciones comerciales no ha sido suficiente para reducir las pérdidas que esta enfermedad provoca a los agricultores, ya que los cultivares desarrollados en el siglo XIX y principios del XX proveyeron una estrecha base genética. Hasta el final del siglo XX el germoplasma disponible consistió en un pequeño número de cultivares de papa resistentes a tizón tardío (Colon, 1994) y para la década de los 80s el 77 % de los cultivares europeos (incluyendo Rusia) y norteamericanos habían introducido genes resistentes a *P. infestans* provenientes sólo de *S. demissum* (Zoteyeva, *et al.*, 2012).

El Instituto Vavilov de Recursos Fitogenéticos (VIR) inició la colecta de especies silvestres de papa en el año de 1926 en México, Guatemala, Colombia, Perú, Bolivia y Chile (Zoteyeva, *et al.*, 2012). Durante 1998-2000 el Instituto de Fitomejoramiento y Aclimatación en coordinación con el Instituto Nacional de Investigación IHAR-PIB (Polonia) utilizaron las semillas colectadas para reconstruir las accesiones del VIR con apoyo financiero del CEEM (Cornell-Eastern Europe-Mexico) proyecto enfocado al control de tizón tardío (Zoteyeva, *et al.*, 2012). Actualmente el VIR cuenta con 2300 variedades de papa de las cuales 320 han sido mejoradas en Rusia y países vecinos (Antonovaa, *et al.*, 2016).

Los factores bióticos y abióticos afectan el desarrollo y rendimiento de los cultivos (Hakeem, *et al.*, 2012; Mahajan y Tuteja 2005). Por lo que las primeras barreras de defensa de la planta ante el ataque de patógenos son la pared celular y cutícula, además de deposiciones de minerales, lignina y calosa las cuales protegen a la planta de amenazas externas (Malinovsky, *et al.*, 2014; Song, *et al.*, 2016). No obstante, durante la interacción planta-patógeno la planta genera una Reacción Hipersensitiva (HR) que desencadena muerte celular programada (PCD) del tejido cercano a la zona de infección y la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Serrano, *et al.*, 2014).

El ataque de *P. infestans* activa una gran cantidad de genes que codifican enzimas que participan en las rutas metabólicas relacionadas con la defensa de la planta como los fenilpropanoides y alcaloides. (Wang, *et al.*, 2005). Sin

Embargo, para eliminar los efectos de ROS, las células activan el metabolismo anti-oxidativo. Catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD) son enzimas que forman parte de este metabolismo. Como parte del sistema de defensa no enzimático los polifenoles son compuestos no proteínicos que contribuyen a eliminar a las especies reactivas de oxígeno (Foyer y Noctor, 2013). Por otra parte, los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas y son esenciales para el crecimiento y reproducción además de que forman parte del sistema de defensa de la planta y contribuyen a la pigmentación (Naczek y Shahidi, 2004). Algunas enzimas como la polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) se relacionan con la oxidación de compuestos fenólicos catalizando la oxidación de fenoles en quinonas, las cuales se polimerizan para formar pigmentos oscuros (Vaughn, *et al.*, 1998). Otros compuestos sintetizados bajo altas concentraciones de ROS son el ácido salicílico (AS) así como la fenilalanina amonio-liasa (PAL) la cual es la primera enzima de la ruta de los fenilpropanoides la cual sintetiza el ácido trans-cinámico precursor del AS (Koukol y Conn, 1961). Cabe mencionar que alta actividad de enzimas antioxidantes son consideradas un potencial bioquímico de la planta para resistir el daño oxidativo (Gill y Tuteja, 2010; Maksimovic, *et al.*, 2013). El objetivo de la presente investigación fue cuantificar el contenido de fenoles totales (FEN) y ácido salicílico (AS) así como la actividad de las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD) y polifenol oxidasa (PPO) en accesiones silvestres de papa (*Solanum tuberosum* spp.). Obtenidas del Instituto Vavilov de Recursos Fitogenéticos (VIR) en respuesta al ataque del oomiceto *Phytophthora infestans*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

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

Los oomicetos son un grupo de organismos pertenecientes a un reino diferente al de los hongos verdaderos ya que se clasifican en el reino protista (Kamoun, 2003). Que pertenece al grupo de los pseudohongos. Este grupo de organismos se caracteriza por la ausencia de quitina en la pared celular mientras que los hongos verdaderos contienen quitina, las paredes celulares de los oomicetos se componen de celulosa, tienen zoosporas biflageladas con un flagelo mastigonemado dirigido hacia delante y otro desnudo que, generalmente, se dirige hacia atrás. Nacen a partir de esporangios, contienen núcleo diploide en células vegetativas y la reproducción sexual se lleva a cabo vía anteridios anférgenos y oogonios. El género *Phytophthora* contiene algunas especies (incluyendo *P. infestans*) que son heterotálicas es decir, presentan el apareamiento A1 y A2 y algunas otras son homotálicas (Fry y Goodwin, 1997).

2.1.2 Origen

P. infestans es originaria del centro de México en esta zona y particularmente el Valle de Toluca se presenta el apareamiento A1 y A2 en proporción 1:1 además de la reproducción sexual (Goss, *et al.*, 2014). Las distintas migraciones ocurridas en siglos pasados han dispersado a este patógeno fuera de su centro de origen (Yoshida, *et al.*, 2013). No obstante, el apareamiento tipo A2 fue dispersado desde México a Europa y demás zonas productivas de papa a finales de la década de 1970s (Fry, *et al.*, 1991). Se cree que la zona centro de México es el lugar de origen del sistema-patógeno *P. infestans*-Solanáceas debido a que esta región es el segundo centro de diversidad del género *Solanum* donde se encuentran muchas especies silvestres de este género resistentes a *P. infestans*. Un ejemplo es *S. demissum* la cual es común en la zona central de México y ha sido fuente de distintos genes de resistencia específicos contra *P. infestans*.

(Wastie, 1991). La población de *P. infestans* en el Valle de Toluca se caracteriza por su diversidad genética y fenotípica (Goodwin y Drenth, 1997; Grünwald, *et al.*, 2001). Esta diversidad entre las poblaciones de *P. infestans* al interior de México se ve favorecida por la capacidad de los esporangios para dispersarse vía aérea por cientos de kilómetros. Además del que el intercambio de tubérculos-semilla entre las distintas zonas productivas ha facilitado la migración de este hongo (Goodwin, *et al.*, 1992). Todos estos factores hacen que este patógeno tenga mucha variabilidad genética lo cual reduce la eficiencia de las aplicaciones de fungicidas y la vida útil de las variedades de papa mejoradas con resistencia vertical (Kurozowa y Paván, 2016).

2.1.3 Ciclo de vida

P. infestans tiene la capacidad de reproducirse de forma sexual y asexual. Infecta y se reproduce en la parte aérea del hospedante y una vez presente en el follaje bajo condiciones ideales el ciclo de vida de esta patógeno puede ser completado en alrededor de cinco días (figura 1). *P. infestans* parasita diversos hospederos del genero *Solanum*, sin embargo, papa y tomate son los más severamente afectados (Flier, *et al.*, 2003; Majeed, *et al.*, 2017).

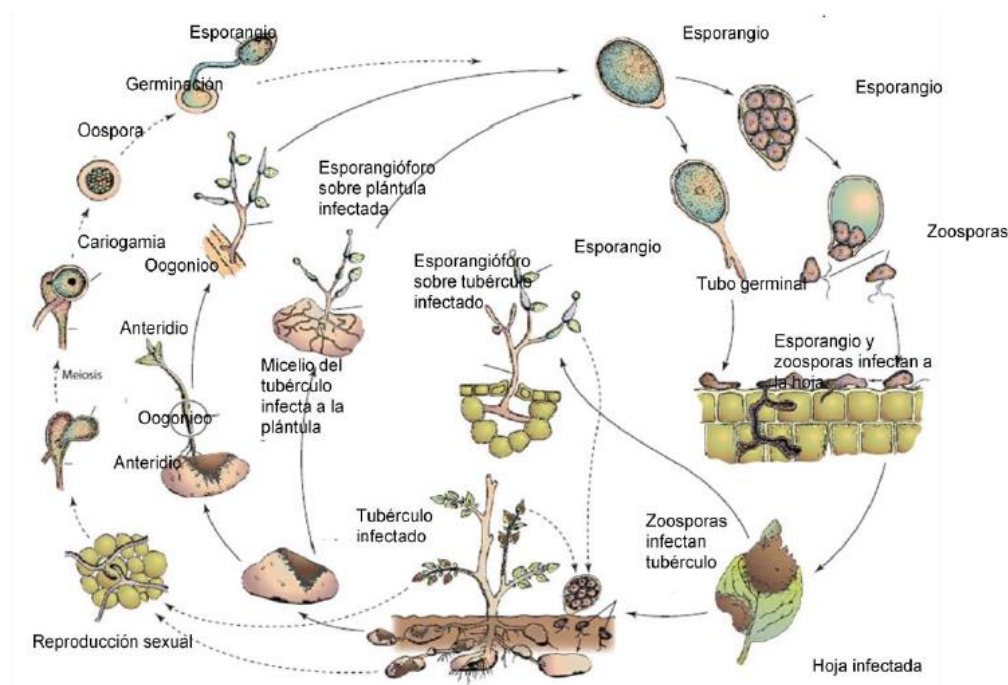


Figura 1. Ciclo de vida *Phytophthora infestans* (Agrios, 2005).

En condiciones de bajas temperaturas y humedad relativa entre 75-80 % *P. infestans* propaga rápidamente su micelio produciendo miles de esporangios y esporangioforos los cuales son dispersados por el viento y son una fuente de infección asexual (Nowicki, *et al.*, 2012). La lluvia lleva las esporas de las hojas al suelo donde estas infectan a los tubérculos. Las zoosporas liberadas desde el esporangio son biflageladas y quimiotácticas lo que les permite moverse sobre películas de agua hacia las hojas de las plantas o a través del suelo. Los esporangios y las zoosporas tienen una vida corta mientras que las oosporas pueden ser viables por muchos años. *P. infestans* se caracteriza por ser heterotálico, es decir, produce esporangios (estructura donde se encuentran las esporas) y esporas asexuales (zoosporas) a partir de la diferenciación de micelio vegetativo. Presenta dos tipos de apareamiento A1 y A2 en su reproducción sexual (Ristaino, 2002; Yuen y Andersson, 2013).

2.1.4 Reproducción sexual y asexual

P. infestans es una especie heterotálica con dos tipos de apareamiento A1 y A2. Ambos tipos de apareamiento son requeridos para que se lleve a cabo la reproducción sexual. Las oosporas son producidas sólo cuando la hifa del tipo de apareamiento opuesto crece en los alrededores del otro durante la infección de tejido de la planta. Una vez que las hifas A1 y A2 hacen contacto se forma la anteridia y el oogonio. El oogonio crece a través del anteridio hasta rodear el tallo oogonial y hay intercambio de citoplasma entre el anteridio y el oogonio. El oogonio se expande rápidamente debido al flujo del citoplasma a través del tallo oogonial. La meiosis ocurre en el gametangio multinucleado. Todos los núcleos del oogonio excepto uno migran hacia la periferia donde se desintegran. Un tubo de fertilización crece desde el anteridio a través de la pared del oogonio para depositar un núcleo en el núcleo del oogonio. Los núcleos se fusionan y mientras la oospora madura se desarrolla una pared delgada. De esta manera cuando hay un potencial hospedante la pared de la oospora se desintegra y esta se libera para infectar al tubérculo recién plantado. El producto final de la reproducción sexual es una oospora diploide. (Govers, *et al.*, 1997). Por lo general las oosporas del grupo de los oomicetos son estructuras altamente resistentes ya que algunas

especies de *P. infestans* pueden sobrevivir en campo por muchos años. Cuando los oosporas sobrevivientes germinan pueden infectar tubérculos y estolones además de tallos y hojas que entran en contacto con el suelo infectado (Drenth, *et al.*, 1995).

Al germinar las oosporas forman esporangióforos que contienen esporangios estos últimos pueden activar su ciclo de reproducción asexual liberando sus zoosporas. El ciclo de vida asexual de *P. infestans* predomina durante la temporada de cultivo de papa ocasionando grandes daños al cultivo (Drenth, *et al.*, 1993). Los esporangios pasan de las plantas infectadas hacia las plantas sanas por medio del agua y viento. La infección de la planta se da por la germinación del tubo de los esporangios y liberación de zoosporas por lo que las lesiones en el follaje o tallo planta comienzan a aparecer en este momento y tomará 2-3 días para que la primera lesión necrótica sea visible. Este ciclo asexual puede repetirse varias veces durante una semana si las condiciones ambientales lo permiten (Nowicki, *et al.*, 2012).

2.1.5 Síntomas

Los síntomas iniciales usualmente aparecen en hojas empapadas de agua, las primeras lesiones pueden presentar apariencia aceitosa, verde-oscuro o café-negro, con forma circular o irregular cerca del margen de las hojas. Usualmente el tejido joven o succulento es el primero en ser infectado. No obstante, bajo condiciones favorables (temperatura 15-22 °C y humedad relativa de 75-80 %) las lesiones se tornan necróticas y el área infectada avanza hasta ocasionar la muerte de folíolos (Figura 2).



Figura 2. Síntomas de tizón tardío en hojas de papa.

La infección puede expandirse a través de los peciolo de las hojas hasta llegar al tallo llegando a dañar el 100 % de la plantación y reduciendo el rendimiento del cultivo de un 50 a 70 % (James, *et al.*, 1971). Si el cultivo no es tratado de manera oportuna el tizón tardío puede causar severos daños ya que las plantas con este grado de infección no sobreviven por más de tres días. En el caso de los tubérculos pueden ser infectados en campo cuando los esporangios son lavados desde las lesiones al follaje y entran en contacto con el suelo. La infección comienza en las grietas del tubérculo, ojos o lenticelas. El tejido infectado es de color cobre, rojizo o violáceo y también puede haber esporulación. Una vez que la infección de los tubérculos avanza aparecen bacterias que causan podredumbre blanda que ocasiona mal olor debido a la pudrición de los tubérculos (Ortiz, *et al.*, 1999). Cabe mencionar que alta humedad relativa favorece la esporulación (esporangios y esporangióforos) la cual se desarrolla en la parte inferior de las hojas infectadas (Keen, 2000). A medida que la infección continúa las lesiones pueden aparecer en cualquier parte de la planta expandiéndose rápidamente, necrosando y causando la muerte de tejido. Cuando las plantas están severamente afectadas emiten un olor característico debido a la rápida descomposición foliar (Gabriel, *et al.*, 2011).

2.2 Mecanismos de defensa de las plantas a nivel celular

Existen tres razones que impiden a un patógeno realizar de manera exitosa el proceso de infección a una planta. (1) La planta es incapaz de proveer los requerimientos necesarios para la supervivencia y desarrollo del patógeno y por lo tanto no es un hospedero. (2) La planta posee barreras estructurales o compuestos tóxicos que detienen la infección y mecanismos anti-patógenos neutralizan la amenaza. (3) Una vez que la planta reconoce a un patógeno los mecanismos de defensa son sintetizados y la invasión permanece confinada. De esta manera el patógeno sólo realiza una infección exitosa si los mecanismos de la planta son ineficaces, es decir, que la planta no sea capaz de detectar al patógeno, y que los mecanismos de defensa sean inefectivos ya que los mecanismos de defensa de la planta se encuentran en todo el tejido de la misma (Osborn, 1996).

2.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxigene Species, ROS)

La respuesta hipersensitiva (HR) de la planta es un mecanismo de defensa a nivel celular y de manera clásica HR se define como la muerte de las células del hospedante dentro de las primeras horas a partir de que el proceso infeccioso comenzó esto con finalidad de limitar el desarrollo del patógeno (Heath, 2000). No obstante, la HR es fenotípicamente diversa, ya que en algunas especies HR puede ocasionar la muerte de algunas células hasta la aparición de zonas cafés o necróticas si muchas células mueren (Holub, *et al.*, 1994). Por otra parte, la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) juega un papel importante en la defensa de la planta ya que la activación de ROS induce la aparición de HR (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Doke y colaboradores (1983, 1988) reportaron por primera vez que los aniones superóxido (O_2^-) era producidos durante interacciones incompatibles entre la papa y *P. infestans* y el tabaco y el virus del mosaico del tabaco (TMV). Estudios posteriores dedujeron que las plantas tienen un mecanismo de producción de O_2^- en el cual se involucra una NADPH oxidasa (Segal y Abo, 1993; Groom *et al.*, 1996). Además de que el O_2^- generado es rápidamente dismutado ya sea de manera no-enzimática o vía superóxido dismutasa (SOD) la cual cataliza al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) siendo H_2O_2 el ROS más importante (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

A partir del descubrimiento de la síntesis de ROS se ha demostrado en cultivos de suspensión celular que en respuesta a la incompatibilidad con bacterias (Baker y Orlandi, 1995) oomicetos (Naton, *et al.*, 1996) y perturbación mecánica de la célula (Gus-Mayer, *et al.*, 1998) se activa la ROS. Además, la ROS tiene una estrecha relación con la apoptosis y ciclo celular (Gilchrist, 1998), contribuyendo a la muerte celular ya que es capaz de detener el ciclo de vida de la célula como parte de la HR contra el ataque de algún patógeno (Kombrink y Somssich, 1995; Lamb y Dixon, 1997; Nürnberger y Scheel, 2001).

La producción de ROS es principalmente apoplástica (Levine, *et al.*, 1994) y bifásica. La primera fase es transitoria y usualmente se lleva a cabo dentro de los primeros minutos de la interacción con el patógeno y la segunda fase es sostenida y ocurre horas después del ataque del patógeno, usualmente esta fase

se asocia con el establecimiento de la HR (Grant y Loake 2000). Las especies reactivas de oxígeno son producidas de manera permanente en los cloroplastos, mitocondria y peroxisomas como un subproducto del metabolismo de la planta. Además, las ROS modula la expresión de genes involucrados en la síntesis de respuestas a estrés de la planta y el establecimiento de defensas adicionales por control redox de factores de transcripción o por interacción con otros componentes de señalización como las cascadas de fosforilación (Kovtun, *et al.*, 2000, Mou, *et al.*, 2003). Aunque las ROS de manera tradicional se asocia con las respuestas de defensa de la planta contra bacterias y hongos, las especies reactivas de oxígeno son producidas en una amplia variedad de interacciones entre la planta y otros organismos (Torres, 2010) y respecto a factores abióticos las ROS ayuda a la planta a producir respuestas adaptativas contra el estrés ambiental. (Grun, *et al.*, 2006; Moreau, *et al.*, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno son sintetizadas en muchos procesos metabólicos aeróbicos en la célula los más comunes son el superóxido y el peróxido de hidrógeno. Los niveles altos de ROS son citotóxicos, aunque niveles bajos son necesarios para la regulación de diversos mecanismos fisiológicos, como la diferenciación celular, apoptosis, división celular y regulación de la transducción de señales redox-sensitivas. Sin embargo, niveles elevados de ROS pueden generar daños como muerte celular, mutaciones y aberraciones cromosómicas (Weydert y Cullen, 2010). La concentración intracelular de ROS depende de la producción y remoción por parte del sistema antioxidante ya que las células contienen un gran número de antioxidantes para prevenir o reparar el daño provocado por ROS y para regular las vías de señalización redox-sensitivas. Las respuestas de defensa de la planta incluyen HR, la producción de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis, flujo de iones a través de la membrana celular, la producción de ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), lignificación y el reforzamiento de la pared celular por medio de las proteínas estructurales de la pared celular y la deposición de calosa (Almagro, *et al.*, 2009). Por lo tanto la eficiencia de estas respuestas de defensa a menudo

determina si la planta es susceptible o resistente a la infección del patógeno (Torres, *et al.*, 2006).

2.3. Superóxido Dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1)

Dentro de la célula la enzima SOD constituye la primera línea de defensa contra ROS. En base al cofactor metálico usado por la enzima SODs se clasifican en tres tipos: Hierro-SOD (Fe-SOD), manganeso-SOD (Mn-SOD), cobre-zinc SOD (Cu-Zn-SOD) (Alscher, *et al.*, 2002; Miller, 2012; Pilon, *et al.*, 2011). Todos estos tipos de SOD se localizan en diferentes partes de la célula. Fe-SOD se localiza en el cloroplasto, citosol, mitocondria y peroxisomas (Arora, *et al.*, 2002; Giannopolitis y Ries, 1977; Inzé y Van Montagu, 1995;). La Mn-SOD en la mitocondria y peroxisomas, Cu-Zn SOD en el cloroplasto, citosol, plastidios y posiblemente en el espacio extracelular (Alscher, *et al.*, 2002).

La SOD pertenece a la familia de las metaloenzimas que catalizan los radicales superóxido a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) mientras que la catalasa y peroxidasa convierten H_2O_2 en agua (H_2O) y en el caso de la catalasa el H_2O_2 es convertido a oxígeno (O_2) y agua. De esta manera el resultado final es que las ROS potencialmente dañinas para la planta (superóxido y peróxido de hidrogeno) son convertidas en agua (Weydert y Cullen, 2010). Cabe mencionar que a pesar de que todos los compartimientos celulares son posibles sitios para la formación de O_2 , los cloroplastos, mitocondria y peroxisomas son los organelos que más ROS generan (Fridovich, 1986) ya que respiración y fotosíntesis son los principales procesos generadores del radical oxígeno (Pilon, *et al.*, 2011). La mayoría de las especies vegetales contienen numerosas isoformas SOD (Alscher *et al.*, 2002; Gill y Tuteja 2010). Sin embargo, la cantidad y tipo de SOD cambia en relación a la especie, etapa fenológica y condiciones ambientales (Alscher *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que hay incremento en la síntesis de Cu-SOD y Fe-SOD en respuesta a factores abióticos como sequía, frío, altas temperatura y estrés osmótico. Por otra parte, el incremento en la concentración de hormonas como citocininas, giberelinas y etileno aumentan la síntesis de Fe-SOD y ácido abscísico incrementa Cu-SOD (Pilon, *et al.*, 2011). Mn-SOD juega un papel

importante en el control de radicales superóxido durante el estrés con NaCl en papa (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2006).

2.4. Peroxidasa (POD, EC. 1.11.1.7)

Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. Forman parte del sistema enzimático que elimina los efectos tóxicos de ROS ya que llevan a cabo la oxidación de una amplia gama de compuestos (donadores de electrones) en la presencia de H_2O_2 . No obstante, en el reino vegetal la familia de las peroxidasas se divide en tres clases en base a las diferencias en su estructura primaria (Akiyoshi, *et al.*, 2003). La clase I incluye peroxidasas procariotas y eucariotas. La clase I juega un papel importante en condiciones de estrés oxidativo y detoxificación de ROS H_2O_2 (Passardi, *et al.*, 2008; Skulachev, 1998). Entre las peroxidasas clase I se encuentran citocromo peroxidasa (CCP; EC 1.11.1.5), ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) y catalasa peroxidasa (CP; EC 1.11.1.6).

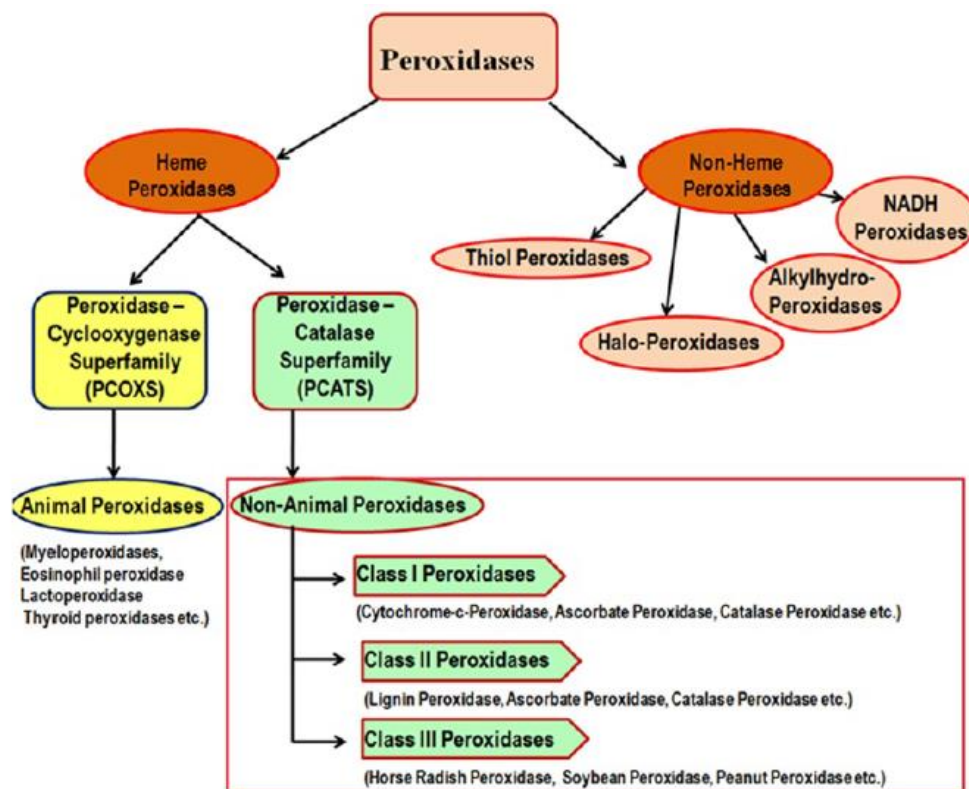


Figura 3. Clasificación de las peroxidasas (Pandey, *et al.*, 2017).

Actualmente, 1839 secuencias de la clase I se han reportado (Pandey, *et al.*, 2017). La CCP usa equivalentes reductores del citocromo c y reduce el peróxido a agua. APX está involucrada en la detoxificación del peróxido de hidrogeno utilizando ascorbato como equivalente reductor además confiere foto-protección a los cloroplastos y citosol en las plantas superiores (Kangasjärvi, *et al.*, 2008; Sharp, *et al.*, 2003).

Las catalasas-peroxidasas (CPs), se han reportado mayormente en bacterias y son enzimas antioxidantes bifuncionales ya que presentan ambos tipos de actividad (Bernroither, *et al.*, 2009). Peroxidasas clase II esta categoría contiene exclusivamente peroxidasas fúngicas, son importantes en la biodegradación de lignina (Piontek, *et al.*, 2001). Los hongos xilófagos poseen peroxidasas de lignina (LiPs; EC. 1.11.1.14). Estas enzimas catalizan la despolimerización de la lignina además de poseer un gran potencial para eliminar residuos fenólicos y no fenólicos. Se han contabilizado 609 secuencias de la clase II (Martínez, *et al.*, 1996; Pérez, *et al.*, 2005). La clase III contiene peroxidasas ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Hiraga, *et al.*, 2001; Tognolli, *et al.*, 2002) y se han reportado 5692 secuencias de peroxidasas pertenecientes a esta clase. Las peroxidasas clase III juegan un papel importante en el ciclo de vida de la planta (Cosio, *et al.*, 2009). Debido a que están involucradas en procesos fisiológicos como crecimiento y diferenciación celular, lignificación (Barceló y Pomer, 2001), suberización (Bernards, *et al.*, 1999), metabolismo de auxinas (Gazaryan, *et al.*, 1996), reparación de heridas (Allison, *et al.*, 2004), crecimiento y maduración de frutos (Huang, *et al.*, 2007), defensa contra patógenos (Bindschedler, *et al.*, 2006), forman parte del metabolismo de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Liszkay, *et al.*, 2003; McInnis, *et al.*, 2006), metabolismo de hormonas y alcaloides (Rasmussen, *et al.*, 1997) entre otros.

Las peroxidasas clase III también juegan un papel importante en la defensa de la planta ya que inducen el reforzamiento de la pared celular mediante la compresión de lignina, suberina, polisacáridos feruloilados y glucoproteínas ricas en hidroxiprolina (Fry, 1986; Vance, *et al.*, 1980). En el cultivo de tabaco existe una correlación positiva entre la actividad de las peroxidasas y la resistencia del

tabaco a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (fuego salvaje) (Simons, et al., 1970). También se ha reportado una rápida inducción de peroxidasas catiónicas en plantas de arroz infectadas por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. (Reimers, et al., 1992).

2.5. Catalasa (CAT, EC. 1.11.1.6)

Las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y superóxido son compuestos esenciales para la activación en cadena de los mecanismos involucrados en la defensa de las plantas contra patógenos y estrés biótico y abiótico (Orozco, et al., 2001). Aunque H_2O_2 comienza a ser aceptado como un mensajero secundario debido a su “larga vida” y alta permeabilidad a través de las membranas celulares (Alvarez, et al., 1998). El contenido de ROS a nivel celular es controlado por la catalasa siendo la enzima antioxidante más importante debido a su alta eficiencia en la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno previniendo el daño por estrés oxidativo (Scandalios, 2001).

Catalasa es una enzima que se encuentra principalmente en los peroxisomas, no obstante, también se puede encontrar en la mitocondria y el citoplasma de las células. En las plantas la catalasa recicla el H_2O_2 generado durante el transporte de electrones mitocondrial, oxidación de ácidos grasos y fotorrespiración oxidativa esta última es la principal fuente de liberación de H_2O_2 en la planta (Scandalios, 2001). Diversas evidencias indican que la catalasa juega un papel importante en la defensa, envejecimiento y senescencia de la planta. Sin embargo, la actividad de la catalasa se ve influenciada por el ácido salicílico y óxido nítrico. Debido a que de manera no-selectiva el ácido salicílico puede inhabilitar la actividad de la catalasa o protegerla de la inactivación esto depende principalmente del estado redox en que la célula se encuentre (Chen, et al., 1993; Durner y Klessig, 1996). (Clark, Durner, Navarre y Klessig (2000) reportaron que el óxido nítrico inhabilita la actividad de la catalasa en plantas de tabaco. No obstante, el proceso de activación e inactivación de la catalasa es aún desconocido (Yang y Poovaiah, 2002). Recientemente, se estableció que la catalasa está presente en tres isoformas (CAT1, CAT2, CAT3) las cuales son codificadas por distintos genes (*Cat1*, *Cat2*, *Cat3*) (Zamocky, et al., 2012).

La importancia de la catalasa en el sistema anti-oxidativo de las plantas se ha reportado en varios estudios y se observó que las plantas con menor actividad CAT fueron más propensas al estrés oxidativo provocado por altos niveles de salinidad, ozono, patógenos y H_2O_2 (Beulah y Ramana, 2013; Miyagawa, *et al.*, 2000; Moriwaki, *et al.*, 2007; Sharma, *et al.*, 2007). Por otra parte, el incremento de la actividad CAT fue crucial en la supervivencia de plantas sometidas a estrés por metales (Willekens, *et al.*, 1997), aunque el estrés severo por metales dañó irreversiblemente a la enzima catalasa (Youssef y Azooz, 2013; Sharma y Travlos, 2012).

2.6. Polifenol oxidasa (PPO, EC. 1.14.18.1)

Polifenol oxidasa es una enzima tetramérica que contiene cuatro átomos de cobre por molécula, posee sitios de unión para compuestos aromáticos y oxígeno. Se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, animal, fungi y bacterias (Mayer, 2006). La PPO es la causa principal de oscurecimiento enzimático en las plantas superiores debido a que PPO cataliza oxidación de fenoles a quinonas, mediante la conversión de monofenoles a o-difenoles y o-dihidroxifenoles a o-quinonas. Las quinonas polimerizan y reaccionan con los aminoácidos de las proteínas celulares originando manchas de color negro, café o rojo (Vaughn, *et al.*, 1988). Estos polímeros dan lugar al oscurecimiento del tejido vegetal producido durante daños mecánicos generando pérdidas en la industria agrícola (Vamos-Vigyazo, 1981). Es común observar este tipo de daños en cultivos como la papa y plátano debido a que presentan altos niveles de PPO. Cuando las células vegetales están sanas, PPOs y sustratos (fenoles) se encuentran en compartimientos separados (cloroplastos y vacuolas respectivamente) no es posible que se lleve a cabo la reacción mencionada anteriormente, sin embargo, ante factores como envejecimiento celular, daño físico y ataque de patógenos, las PPOs entran en contacto con los fenoles debido a la pérdida de los compartimientos celulares (Thygesen, *et al.*, 1995). Las pérdidas causadas por oscurecimiento representan alrededor del 50 % en la producción industrial de frutas y hortalizas (Holderbaum, *et al.*, 2010).

Las PPO se localizan en los plastidios y aunque esta enzima se asocia con la membrana, no es una proteína integral de la membrana (Vaughn, *et al.*, 1988). Por otra parte, PPO está involucrada en el mecanismo de defensa contra patógenos (Mayer, 1987; Thipyapong, *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la inducción de una isoforma de PPO en plantas de tomate susceptibles a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Alternaria solani* aumenta la resistencia a estas enfermedades (Thipyapong y Steffens, 1997). En lo sucesivo la sobreexpresión de PPO en tomate lleva a un aumento significativo en la resistencia a *P. syringae* pv. *tomato* (Li y Steffens, 2002).

2.7. Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas que tienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (Beckman, 2000; Valcarcel, *et al.*, 2015). En general son sintetizados ya sea por la ruta del ácido shikímico o del ácido malónico o por las dos como es el caso de los flavonoides. Estos compuestos de acuerdo a su estructura química pueden ser divididos en flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, ligninas, estilbenos y cumarinas (Ignat, *et al.*, 2011; Lemos, *et al.*, 2015). La papa contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales están presentes en la peridermis y pulpa de los tubérculos, no obstante, la peridermis se ha reportado con las mayores cantidades de compuestos fenólicos (Ezekiel, *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos mayormente presentes en el tubérculo papa son flavonoides incluyendo los favonoles y antocianinas (Deußer, *et al.*, 2012). En cuanto a la biosíntesis de los compuestos fenólicos en las plantas superiores la ruta del ácido shikímico participa en la biosíntesis de los fenoles utilizando como sustrato la eritrosa-4-fosfato (ruta de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenolpirúvico (proveniente del glucólisis) (Figura 4). La fenilalanina es uno de los principales productos de esta síntesis y a partir de esta se derivan la mayoría de los compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger 2006).

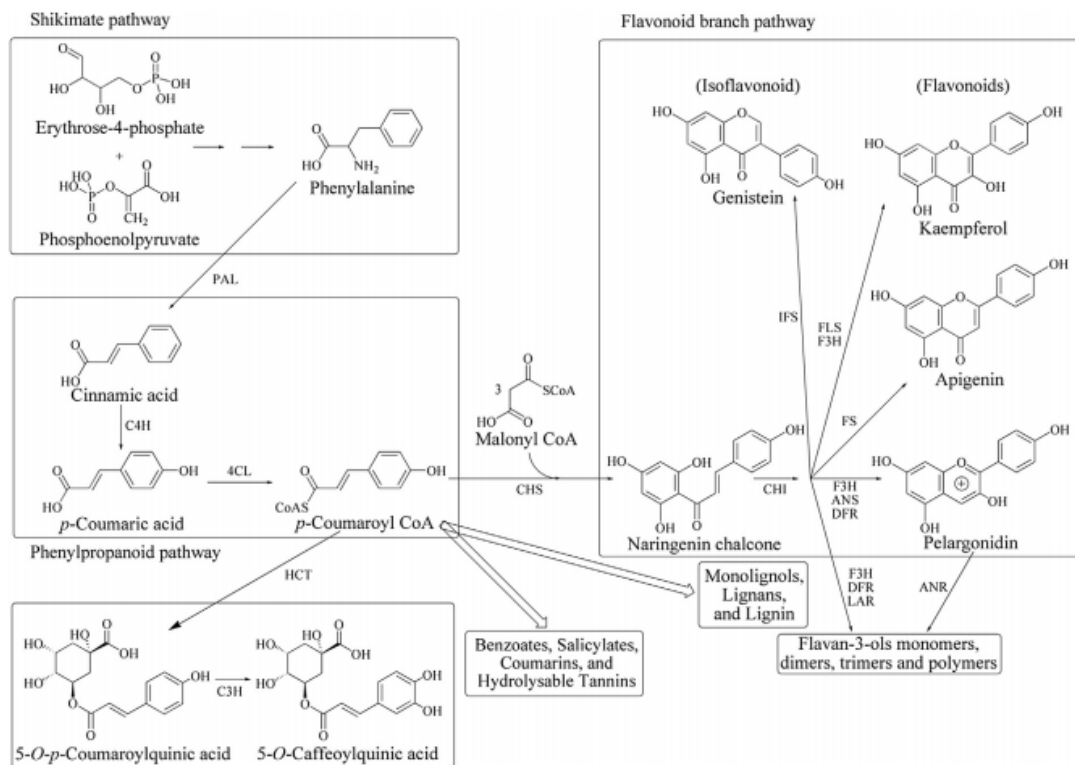


Figura 4. Representación esquemática de la ruta del ácido shikímico, ruta del ácido malónico y sus derivados (Cheynier, et al., 2013).

Por otra parte, la ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en bacterias y hongos. En las plantas superiores esta ruta existe, sin embargo, no es tan utilizada como en los hongos y bacterias. El sustrato de esta ruta es la acetil-CoA y junto a la ruta del ácido shikímico llevan a cabo la síntesis flavonoides, lignina y otros fenoles (Taiz y Zeiger, 2006).

La acumulación de fenoles en el tejido de las plantas se considera como una respuesta adaptativa ya que los compuestos fenólicos tienen un papel importante como en la defensa hacia estrés ambiental y ataque de patógenos. Lo cual incrementa en las plantas la producción de radicales libres y otras especies oxidativas. Aunque, la inducción de los genes del metabolismo secundario por estrés biótico y abiótico es moderado por moléculas como el ácido salicílico, ácido jasmónico y sus derivados (Winkel, 2002). Los compuestos fenólicos son partes ligninas y suberinas las cuales incrementan la resistencia y soporte mecánico de la pared celular. Además, de que esto aumenta la protección contra infecciones microbianas (Dai, et al., 1995).

2.8. Fenilalanina Amonio-liasa (PAL, EC. 4.3.1.5)

La fenilalanina es un aminoácido esencial que parte del metabolismo primario de animales y plantas. Este aminoácido entra al metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio de la molécula de fenilalanina formando el ácido cinámico (Koukol y Conn, 1961). Los fenilpropanoides son compuestos derivados del ácido cinámico, el cual es formado por la fenilalanina (Vogt, 2010). La PAL cataliza la desaminación no oxidativa de la fenilalanina a ácido trans-cinámico, este es el primer paso de la ruta de los fenilpropanoides y es un punto de regulación entre el metabolismo primario y secundario figura 5, (Huang, *et al.*, 2010; Hyun, *et al.*, 2011; Vogt, 2010).

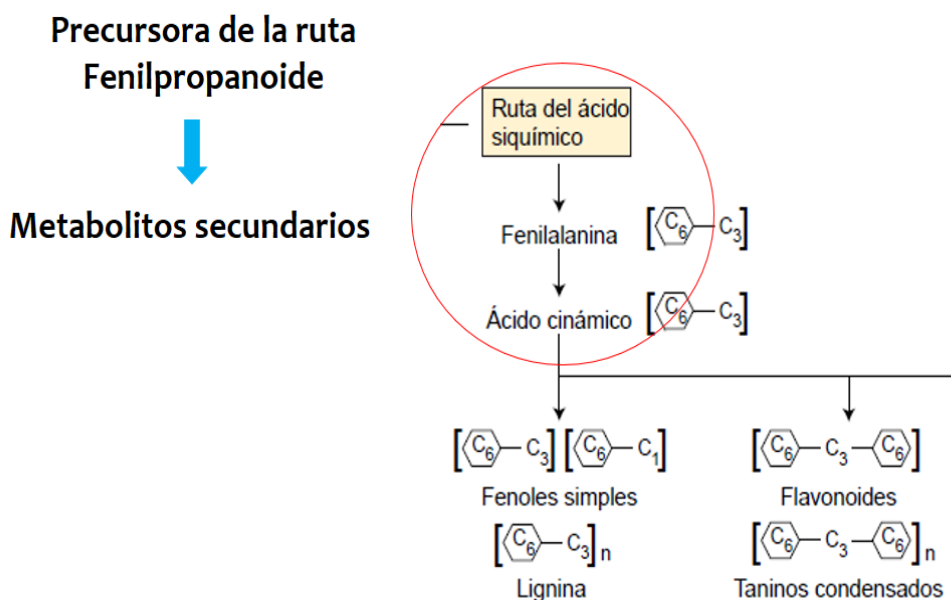


Figura 5. PAL y sus derivados

La PAL ha sido ampliamente estudiada y la importancia de esta enzima en el metabolismo de las plantas se ha demostrado por la diversidad de los productos derivados de fenilpropanoides encontrados en las plantas (Jones, 1984). De este modo los fenilpropanoides son precursores de una amplia gama de compuestos fenólicos como flavonoides, isoflavonoides, antocininas, hormonas, fitoalexinas, y ligninas (La Camera, *et al.*, 2004). Tienen funciones importantes en muchas rutas bioquímicas entre las cuales destacan defensa de las plantas contra

patógenos y depredadores, protección contra radiación UV, transducción de señales y comunicación con otros organismos y como moléculas regulatorias (Ferrer, *et al.*, 2008; Vogt, 2010).

La PAL es la enzima clave en la síntesis de metabolitos secundarios relacionados con la defensa de la planta como los son los compuestos fenólicos y ligninas (Hemm, *et al.*, 2004). Por lo que derivado de esta síntesis hay estimulación de deposición de lignina y polímeros fenólicos en el tejido afectado de la planta dando origen a la formación de nuevas barreras de defensa contra el patógeno (Jones, 1984). Se ha demostrado que la resistencia a enfermedades está relacionada con la síntesis de compuestos fenólicos (Vanitha, *et al.*, 2008). Adicionalmente PAL es una enzima inducible que responde a estrés biótico y abiótico como el ataque de patógenos, heridas, falta de nutrientes, radiación UV y reducción de temperatura (Huang, *et al.*, 2010; Jin, *et al.*, 2013; Payyavula, *et al.*, 2012).

2.9. Ácido salicílico (AS)

El ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Sánchez, *et al.*, 2010). La L-fenilalanina tiene dos vías de conversión a AS, la primera es mediante el intermediario benzoato y la segunda mediante el ácido cumárico por medio de una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la PAL. Adicionalmente el corismato puede ser convertido en AS vía isocorismato a través de las enzimas Isocorismato Sintasa (ICS) e Isocorismato Piruvato Liasa (IPL) (figura 6) (Verberne, *et al.*, 2000; Wildermuth, *et al.*, 2001)

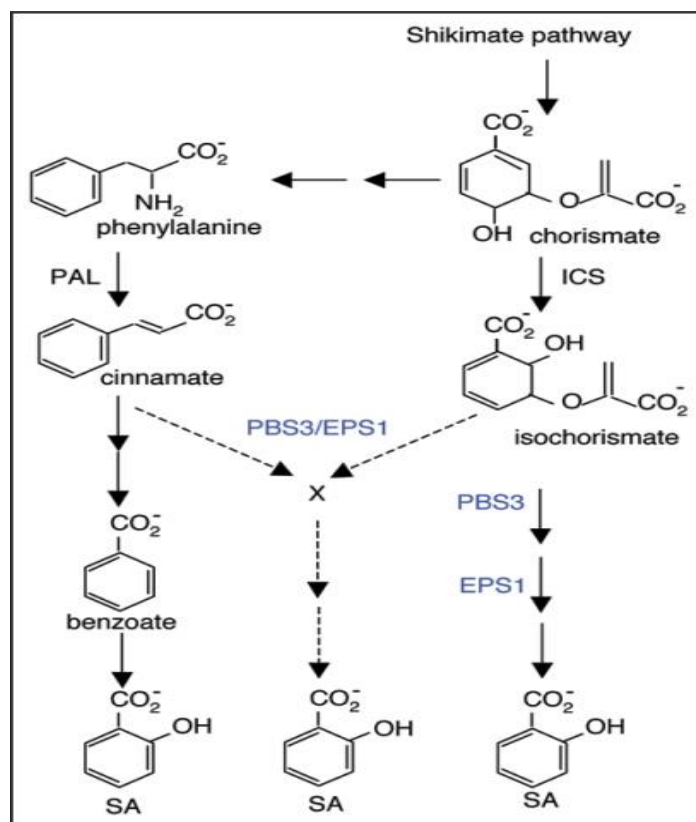


Figura 6. Rutas de síntesis del ácido salicílico

Cabe mencionar que en *Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana* y tomate (*Solanum lycopersicum*) la mayoría del AS sintetizado en respuesta al ataque de patógenos es por la segunda vía (Catinot, *et al.*, 2008; Uppalapati, *et al.*, 2007). El AS juega un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, interacción con otros organismos y en las respuestas contra el estrés ambiental (Senaratna, *et al.*, 2000). Además, participa en glicolisis, rendimiento de fruto y floración en plantas termogénicas (Klessig y Malamy, 1994). Absorción y transporte de iones (Harper y Balke, 1981). Tasa fotosintética, conductancia estomática y transpiración (Khan, *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha encontrado que el AS puede afectar de manera indirecta la síntesis y/o señalización de otras hormonas entre las cuales están la vía del ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), y auxinas (figura 7), (Balbi y Devoto 2008; Loake y Grant 2007).

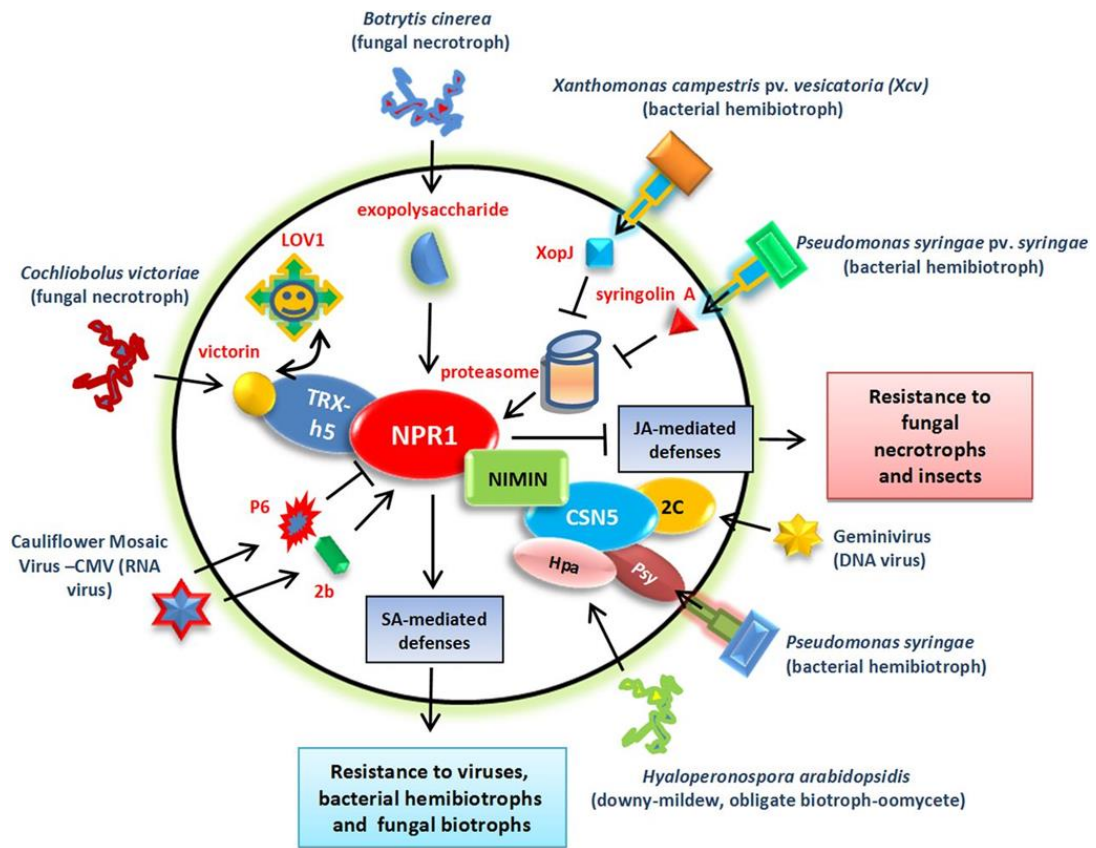


Figura 7. "Effectors from Diverse Pathogens Indirectly Target a Master Regulator of SA Signaling, to Promote Disease Development".

Kemal Kazan, y Rebecca Lyons Plant Cell 2014;26:2285-2309

2.10. Relación entre enzimas

2.10.1. Relación SOD, CAT, POX y PPO

Para proteger las células del daño oxidativo generado por el exceso de ROS durante la interacción hospedante-patógeno las plantas han desarrollado un complejo sistema de antioxidantes enzimáticos como lo son la peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. Las cuales junto con las enzimas provenientes del ciclo ascorbato-glutatión (ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), entre otras, ayudan en la eliminación de ROS (Li, *et al.*, 2015). En el sistema de defensa antioxidante también se incluyen los carotenoides, ascorbato, glutatión y tocoferoles (Foyer, *et al.*, 1995).

La SOD es la enzima más importante para eliminar ROS ya que juega un papel importante en la protección celular contra ROS a través de la dismutación de los

radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. (Spychalla, y Desborough, 1990; De Gara, *et al.*, 2003). Mahmoud, *et al.* 2019 encontraron un incremento significativo en la actividad de la SOD de hojas infectadas por *P. infestans*, el incremento de SOD junto con la reducción del H_2O_2 en las etapas tardías de la infección en las hojas del cultivar Ovatio indicaron que las plantas resistentes eliminaron ROS con mayor eficiencia que las susceptibles. Por lo que una alta actividad de SOD en el cultivar Ovatio puede ser una estrategia para restringir la etapa necotrófica del patógeno mediante la aliviación del estrés oxidativo. Debona, *et al.* (2012) afirmaron que la actividad de SOD incrementó en las hojas de plantas de trigo en respuesta a la infección por *P. oryzae*. En tomate, la actividad de la SOD aumentó en los peroxisomas durante el estado inicial de la infección por *Botrytis cinérea*, dicha actividad se redujo a medida que las lesiones necróticas iban apareciendo (Kuzniak y Sklodowska, 2005). En fresa el contenido de SOD mostró un incremento en las hojas infectadas por *Mycosphaerella fragariae* sin embargo, en los cultivares resistentes la actividad de esta enzima fue superior a los susceptibles (Ehsani-Moghaddam, *et al.*, 2006). Por lo que alta concentración de SOD en cultivares resistentes puede ser una estrategia para restringir la colonización de patógenos (Ehsani-Moghaddam, *et al.*, 2006).

Por otra parte, la CAT es una enzima antioxidante que regula ROS además de combatir las reacciones oxidativas mediante la eliminación del peróxido de hidrógeno: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Spychalla, y Desborough, 1990). (Arora, *et al.*, 2002; De Gara, *et al.*, 2003). Mahmoud, *et al.* (2019) encontraron que la actividad de CAT incrementó significativamente en respuesta a la infección de *P. infestas* en dos cultivares de papa. Sin embargo, en los estados posteriores de infección se observó una mayor actividad enzimática en las plantas del cultivar resistente. La diferencia en la actividad de CAT entre los dos cultivares sugiere que esta enzima juega un papel importante en la resistencia del cultivo de papa contra tizón tardío. Cabe mencionar que alta actividad de CAT se asoció con la resistencia a *P. oryzae* en trigo (Debona *et al.*, 2012) y *Corynespora cassiicola* en soya (Fortunato, *et al.*, 2015). De acuerdo con Kuzniak y Sklodowska, (2005) en el

cultivo de tomate la actividad de SOD y CAT aumentaron durante el estado inicial de la infección por *B. cinerea* y se redujo después de la formación de lesiones necróticas Magbanua, *et al.* (2007). demostraron que la actividad de CAT fue superior en hojas de maíz de las líneas resistentes a *Aspergillus flavus* mientras que las líneas susceptibles tuvieron una actividad menor. La reducción en la actividad de CAT se puede explicar debido a la generación de una proteólisis causada por endopeptidasas peroxisomales, las cuales son inducidas por el estrés oxidativo (Palma, *et al.*, 2002). Sin embargo, esta reducción usualmente aumenta la resistencia al ataque de patógenos debido a que las plantas pueden mantener altas concentraciones de H_2O_2 (Magbanua, *et al.*, 2007).

La POX esta involucrada en la remoción de H_2O_2 , ya que esta enzima juega un papel importante en la defensa de la planta contra patógenos debido a su participación en la síntesis de lignina (Rauyaree, *et al.*, 2001). Hong-xia, *et al.* (2011) determinaron que la actividad de POX fue más importante en los cultivares de trigo resistentes que los susceptibles cuando estos fueron infectados con *Rhizoctonia cereales*. Una alta actividad de POX en hojas de plantas de trigo en los últimos estados de infección fue fundamental en la resistencia contra *Pyricularia* (Xavier, *et al.*, 2011).

Las PPOs catalizan la oxidación de fenoles a quinonas que pueden causar modificaciones covalentes y enlaces cruzados sustituyentes nucleofílicos de aminoácidos y proteínas y se cree que ejercen una defensa antinutritiva contra los patógenos. Por lo tanto, la inducción sistémica de estos compuestos y enzimas en respuesta a patógenos proporciona una línea de defensa adicional que protege a la planta de futuros ataques de patógenos (Jiang, *et al.*, 2019). Khodadadi, *et al.* (2016), investigaron que el incremento en la actividad PPO era casi dos veces superior en cultivares de nuez resistentes a tizón que en los cultivares poco resistentes. Es importante mencionar que la oxidación de compuestos fenolicos en o-quinonas, resulta en la formación de compuestos tóxicos para los patógenos y debido a esto la actividad PPO en las plantas se incrementa cuando se presentan infecciones fúngicas (Mohammadi y Kazemi, 2002).

Naglaa y Heba, (2011), encontraron un aumento en la actividad de PPO en líneas de linaza resistentes a oídio, la actividad de esta enzima era significativamente menor en los cultivares susceptibles. Mohammadi y Kazemi (2002) observaron incremento de la actividad específica de PPO en conidia de cultivares de trigo resistentes a *F. graminearum* después de que este patógeno se inoculó en las plantas.

Las enzimas SOD, CAT y POX son indicadores bioquímicos de la resistencia a enfermedades (Peters, *et al.*, 2011; Su, *et al.*, 2016). Ya que forman parte del grupo de enzimas removedoras de H₂O₂ entre las cuales se incluye también APX, glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPX), y glutatión reductasa (GR) (Dixon, *et al.*, 2010; Mittler, 2002). Por lo que las enzimas antioxidantes más importantes en el control de ROS durante el ataque de patógenos son peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), Polifenol oxidasa (PPO) y ascorbato peroxidasa (APX) (Naglaa y Heba 2011).

2.10.2. Relación entre PAL, FEN y AS

En plantas resistentes a enfermedades, las respuestas de defensa basadas en la síntesis de fenoles se caracterizan por la temprana y rápida acumulación de fenoles en el sitio de infección, lo que ocasiona el aislamiento del patógeno. Resultados de diversos estudios sugieren que la esterificación de fenoles en compuestos que forman parte de la pared celular y la acumulación y deposición de fenoles en las paredes celulares se considera como un aumento en la resistencia a las enzimas hidrolíticas fúngicas además de que representan una barrera física contra el proceso de infección de los hongos (Stadnik y Buchenauer, 2000). Algunos estudios han demostrado que la alteración en el nivel de compuestos fenólicos en las plantas puede cambiar la susceptibilidad a enfermedades. Mikulic-Petkovsek, *et al.*, (2011) encontraron que el contenido acumulativo de diez determinados polifenoles en nueces sanas dependía del cultivar y se correlacionaba débilmente con la susceptibilidad a tizón. De manera similar, la reducción de los niveles de fenilpropanoides por la co-supresión de PAL aumenta la susceptibilidad a enfermedades (Maher, *et al.*, 1994). Diferentes

estudios indican que hay incremento de la síntesis de fenoles en plantas cuando éstas son atacadas por patógenos (figura 8), (De Ascensao y Dubrey, 2003).

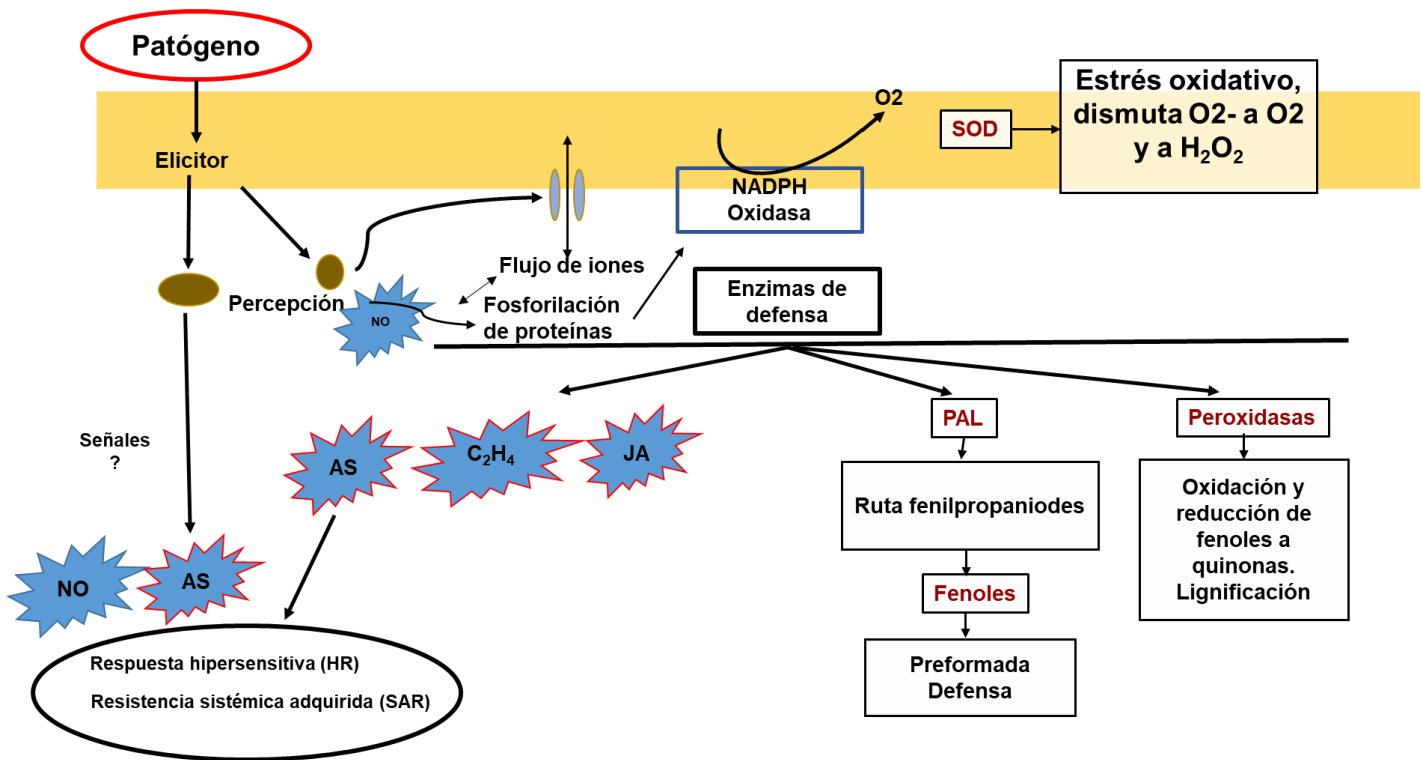


Figura 8. Respuestas de defensa de la planta (De Ascensao y Dubrey, 2003).

Los fenoles son a menudo sintetizados y acumulados en las capas superepidermicas de los tejidos de la planta expuestos a estrés y al ataque de patógenos (Clé, *et al.*, 2008; Schmitz-Hoerner y Weissenböck, 2003). Diversos factores externos e internos (heridas, estrés hídrico, y ataque de patógenos) afectan la acumulación y síntesis de compuestos fenólicos (Kefeli, *et al.*, 2003; Zapprometov, 1989). Los compuestos fenólicos tienen la función de repeler y atraer diferentes organismos ya que actúan como agentes de protección, inhibidores, y tienen efecto tóxico y plaguicida (herbívoros, nematodos, insectos fitófagos, hongos y bacterias) (Dakora y Phillips, 1996; Lattanzio, *et al.*, 2006).

Las plantas responden al ataque de patógenos mediante la acumulación de fitoalexinas, como hidroxycumarinas y conjugados de hidroxycinamato (Karou *et al.*, 2005). La síntesis y acumulación y liberación de fenoles de manera particular ácido salicílico (Boller y He, 2009; Lu, 2009), son cruciales en las diferentes

estrategias de defensa contra patógenas empleadas por la planta (Bhattacharya, *et al.*, 2010). Los Tratamientos con ácido salicílico han demostrado aumento en la resistencia en muchas especies de plantas e incrementa los niveles endógenos de AS lo cual se correlaciona con la activación de los sistemas de defensa locales y/o sistémicos (Klessig y Malamy, 1994; Vlot *et al.*, 2009).

El ácido salicílico es requerido por las plantas para la transducción de señales a nivel local ya que AS es inducido por altas concentraciones de H_2O_2 reduciendo la actividad de la catalasa lo que genera un incremento en la concentración de H_2O_2 (Vernooij, *et al.*, 1994b; León, *et al.*, 1995). AS además de mediar la concentración de H_2O_2 y conferir protección contra el estrés (Dat, *et al.*, 2000; Chao, *et al.*, 2009). Tiene un papel importante en la protección contra factores bióticos y abióticos mediante la regulación del sistema antioxidante de la planta (He y Zhu 2008; Hayat, *et al.*, 2009).

Diversos estudios indican que el AS es un señalizador y es importante en la resistencia a enfermedades en las plantas (Chen, *et al.*, 1995; Ryals, *et al.*, 1996). En distintas especies de plantas una concentración elevada de AS se ha asociado con la resistencia de la planta infectada contra el patógeno invasor (Malamy, *et al.*, 1990; Métraux, *et al.*, 1990). Debido a esto el incremento sistémico en los niveles de AS es primordial en la inducción de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Ryals, *et al.*, 1996).

En el cultivo de papa (Coquoz *et al.*, 1995) y arroz (Silverman, 1995) hay una correlación directa entre la cantidad de endógena de ácido salicílico y la resistencia a patógenos. Por lo que se considera que altas concentraciones de AS representa una respuesta importante contra el estrés (Hayat, *et al.*, 2009). La aplicación exógena de AS en concentraciones bajas puede regular estrés biótico y abiótico (Elwan y El-Hamahmy 2009). Además, promueve la resistencia contra enfermedades virales, fúngicas y bacterianas en una gran variedad de especies monocotiledones y dicotiledóneas (Hayat, *et al.*, 2009). En tomate, AS induce resistencia a *Fusarium* debido al incremento en la actividad PAL y POX (Mandal, *et al.*, 2009). La aplicación de AS en *Cucurbita pepo* (Radwan, *et al.*, 2006) y tomate cherry (Xu y Tiang 2008) activa el sistema antioxidante para aliviar el

estrés oxidativo causado por la infección de patógenos. El AS aumenta la resistencia a *Fusarium leaf blight* e inhibe la acumulación de micotoxinas producidas por *Fusarium* (Qi, *et al.*, 2012).

La ruta de fenilpropanoides en las plantas ha sido una adaptación importante que les permite soportar estrés biótico y abiótico (Ferrer, *et al.*, 2008). El incremento en la actividad de PAL estimula la biosíntesis de metabolitos como fitoalexinas, fenoles, ligninas y ácido salicílico, en cuanto a las rutas de defensa de la planta la PAL mejora las defensas contra patógenos hemibiotróficos y biotróficos (Makandar, *et al.*, 2012). Los fenilpropanoides son precursores de una amplia gama de compuestos fenólicos como flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, hormonas, fitoalexinas y ligninas (La Camera, *et al.*, 2004). La PAL participa en el metabolismo de los compuestos fenólicos, la ruta metabólica de fitoalexinas e induce la síntesis de ácido salicílico. En la ruta de biosíntesis de AS, el ácido corísmico es convertido a AS por medio de la fenilalanina. El ácido cinámico es intermediario en los productos de PAL y luego se convierte en SA. Cabe mencionar que AS es un mensajero secundario en el proceso de inducción de resistencia a estrés biótico en las plantas (Barna, *et al.*, 2012).

La PAL es una enzima inducible que responde al estrés biótico y abiótico como patógenos, radiación UV y bajas temperaturas (MacDonald y D'Cunha, 2007). Juega un papel importante en la defensa de la planta ya que está involucrada en la biosíntesis de AS el cual es un señalizador involucrado en la resistencia sistémica de la planta (Chaman, *et al.*, 2003). La expresión génica de la enzima PAL responde a una gran variedad de estrés ambientales, incluyendo infecciones por patógenos, heridas, falta de nutrientes, radiación UV y temperaturas extremas (Payyavula, *et al.*, 2012). La capacidad de los hongos patógenos para inducir resistencia sistémica adquirida (SAR) está determinada por la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (Dubá, *et al.*, 2019). Pritsch, *et al.* (2001) demostraron que los genes de defensa pueden expresar PAL en el sitio donde inició la infección y además en tejidos distantes al sitio de infección.

2.11. Antecedentes del VIR

La colección *Solanum* del Instituto Ruso de la Industria de Plantas (VIR) se inició con las muestras recogidas en 1925-1926 por Bukasov, Voronov y Juzepczuk en México, Guatemala y Colombia, y en 1926-1928 por Juzepczuk en el sur y centro de Perú, norte de Bolivia y Chile (Juzepczuk y Bukasov 1929; Juzepczuk y Bukasov 1936). Durante muchos años este germoplasma fue evaluado y utilizado en la generación de variedades de papa en Rusia. Sin embargo, la crisis financiera de la década de 1990 causó dificultades en el mantenimiento y evaluación de los materiales, y aumentó el riesgo de las pérdidas por accesión (Zoteyeva *et al.*, 2012).

En 1998-2000, las accesiones de la colección VIR fueron reconstruidas a partir de semillas verdaderas antiguas en IHAR-PIB, Centro de Investigación de Młochów (Polonia) con apoyo financiero de Proyecto CEEM (Cornell-Europa del Este-México) sobre el control tardío de las manchas. Durante esos 3 años, las 305 accesiones de especies silvestres de papa de la colección VIR fueron sembradas en Młochów. Se obtuvieron reproducciones de semillas o tubérculos para 147 accesiones. Las muestras de semillas reproducidas se dividieron en tres partes y se distribuyeron a las colecciones de papa de VIR, IHAR-Młochów y PI, Sturgeon Bay (Wisconsin, EE. UU.) (Raman *et al.*, 2000).

La Universidad del Estado de Moscow (Moscow State University) en Rusia, además trabaja con el CEEM en la biología e identificación de cepas virulentas y agresivas de *P. infestans* en Rusia. (Raman *et al.*, 2000). El proyecto Toluca International Late Blight (TILB) es un ejemplo de colaboración en el trabajo. Permite a los científicos estudiar la biología y la epidemiología del tizón tardío en el área geográfica donde las especies de papas silvestres y el patógeno siguieron caminos paralelos de evolución (Raman *et al.*, 2000).

2.12. Literatura citada

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press. U.S.A 922 p.
- Akiyoshi K., Etsuko M., Saori E., Shinkichi K., Kazuya Y., Atsuhiko S., y Hiroyasu E. (2003). Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiology*, 132,1177-1185.
- Allison, S. D. y Schultz, J. (2004). Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth and plant hormones in northern red oak. *Journal of Chemical Ecology*, 30(7),1363-1379.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro S., Bru, R., Ros Barceló, A. y Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2),377–390.
- Alscher, R. G., Erturk, N., y Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372),1331-1341.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. y Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92(6),773–784.
- Antonovaa, O. Y., Shvachko, N. A., Novikova, L. Y., Shuvalov, O. Y., Kostina, L. I., Klimenko, N. S., Shuvalova, A. R., y Gavrilenko, T. A. (2016). Genetic Diversity of Potato Varieties Bred in Russia and Its Neighboring Countries Based on the Polymorphism of SSR-Loci and Markers Associated with Resistance *R*-Genes. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 7(5),489-500.
- Arora, A., Sairam, R. K. y Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10),1227-1238.
- Baker, C. J., y Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33,299-321.
- Balbi, V. y Devoto, A. (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*, 177(2), 301-318.

- Barceló, A. R. y Pomer, F. (2001). Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry*, 57(7),1105-1113.
- Barna, B., Fodor, J., Harrach, B. D., Pogány, M., y Király, Z. (2012). The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59,37-43.
- Beckman, C. (2000). Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110.
- Bernards, M. A., Fleming, W. D., Llewellyn, D. B., Priefer, R., y Yang, X., Sabatino, A. y Plourde, G. L. (1999). Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology*, 121(1),135-146.
- Bernroither, M., Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Peschek, G. A., y Obinger, C. (2009). Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *Journal of Experimental Botanic*, 60(2),423-440.
- Beulah, K. y Ramana, T. (2013). Purification, properties and kinetic studies of catalase from leaves of *phyllanthus reticulatus*. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Science*, 3(3),940-948.
- Bhattacharya, A., Sood, P., y Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 11(5),705-719.
- Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K. A., Stone, J. M., Asai, T., Plotnikov. J., Bolwell, G. P. (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47(6),851-863.

- Boller, T. y He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324(5928),742-744.
- Brylinska, M., Sobkowiak, S., Stefanczyk, E., y Sliwka, J. (2016). Potato cultivation system affects population structure of *Phytophthora infestans*. *Fungal Ecology*, 20,132-143.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., y Métraux, J. P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582(4),473-478.
- Chaman, M. E., Copaja, S. V., Argandona, V. H. (2003). Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2227-2231.
- Chao, Y. Y., Chen, C. Y., Huang, W. D., y Kao, C. H. (2009). Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant and Soil*, 329,327-337.
- Chen, Z., Malamy, J., Hennig, J., Conrath, U., Sanchez-Casas, P., Ricigliano, J., Silva, H., y Klessig, D. F. (1995). Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10),4134-4137.
- Chen, Z., Silva, H., y Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262(5141), 1883-1886.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., y Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72,1-20.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D. A. y Klessig, D. F. (2000). Nitric Oxide Inhibition of Tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12),1380-1384.

- Clé, C., Hill, L.M., Niggeweg, R., Martin, C.R., Guisez, Y., Prinsen, E. and Jansen, M.A.K. (2008). Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry*, 69(11),2149-2156.
- Colon, L. (1994). Resistance to *Phytophthora infestans* in *Solanum tuberosum* and wild *Solanum* species. (Ph.D thesis). Wageningen-University. Países bajos.
- Coquoz, J. L., Buchala, A. J., Meuwly, Ph., Me´traux, J. P. (1995). Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology*, 85,1219-1224.
- Cosio, C. y Dunand, C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60,391-408.
- Dai, G. H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., y Boubais, D. (1995). Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology*, 101,541-547.
- Dakora, F. D. y Phillips, D. A. (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(1),1-20.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., y Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(5),779-795.
- De Ascensao, A. F., Dubrey, I. A. (2003). Soluble and wall-bound phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum*.sp. cubens. *Phytochemistry*, 63(6),679-686.
- De Gara L., De Pinto M. C., y Tommasi, F. (2003). The antioxidant system Visà-Vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41,863-870.

- Debona, D., Ávila, R. F., Alberto, R. J., y Telles, N. J. (2012). Biochemical Changes in the Leaves of Wheat Plants Infected by *Pyricularia oryzae*. *Biochemistry and Cell Biology*, 102(12),1121-1129.
- Debona, D., Rodrigues, F. A., Rios, J. A., y Nascimento, K. J. T. (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 102(12),1121-1129.
- Deußer, H., Guignard, C., Hoffmann, L., y Evers, D. (2012). Polyphenol and glycoalkaloid contents in potato cultivars grown in Luxembourg. *Food Chemistry*, 135(4),2814-2824.
- Dixon, D. P., Skipsey, M., y Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4),338-350.
- Doke, N. (1983). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology*, 23(3),359-367.
- Doke, N. y Ohashi, Y. (1988). Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32,163-175.
- Drenth A., Goodwin S. B., Fry, W. E., y Davidse, L. C. (1993). Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in The Netherlands revealed by DNA polymorphisms. *Phytopatology*, 83,1087-1092.
- Drenth, A., Janssen, E. M. y Govers, F. (1995). Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology*,44,86-94.
- Duba, A., Goriewa-Duba, K., Wachowska, U., Głowacka, K., y Wiwart, M. (2019). The Associations between Leaf Morphology, Phenylalanine Ammonia Lyase Activity, Reactive Oxygen Species, and Fusarium Resistance in Selected Species of Wheat with Different Ploidy Levels. *Plants*, 8(10), 1-19.

- Durner, J. y Klessig, D. F. (1996). Salicylic Acid Is a Modulator of Tobacco and Mammalian Catalases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45),28492-28501.
- Ehsani-Moghaddam, B., Charles, M. T., Carisse, O., y Khanizadeh, S. (2006). Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. *Journal of Plant Physiology*, 163(2),147-153.
- Elwan, M. W. M., y El-Hamahmy, M. A. M. (2009). Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in green house. *Scientia Horticulturae*, 122,521-526.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Ezekiel, R., Singh, N., Sharma, S., y Kaur, A. (2013). Beneficial phytochemicals in potato-a review. *Food Research International*, 50,487-496.
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C. Jr., Noel, J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356-370.
- Flier, W. G., Van den Bosch, G., y Turkensteen, L. J., (2003). Epidemiological importance of *Solanum sisymbriifolium*, *S. nigrum* and *S. dulcamara* as alternative hosts for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 52(5),595-603.
- Fortunato, A. A., Debona, D., Bernardeli, A. M. A., Rodrigues, F. A. (2015). Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 105(8),1050-1058.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. (2013). Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16),2087-2090.
- Foyer, C. H., Descourvieres, P., y Kunert, K. J. (1995). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, 17(5),507-523.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 58,61-97.

- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cells of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37,165-186.
- Fry, W. E. (1998). Late blight of potatoes and tomatoes. Department of Plant Pathology, NYS College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca, NY. Recuperado de <https://hdl.handle.net/1813/43281>
- Fry, W. E. y Goodwin, S. B. (1997). Re-emergence of tomato and potato late blight in the United States. *Plant disease*, 81(12),1349-1347.
- Fry, W. E., Drenth, A., Spielman, L. J., Mantel, B. C., Davidse, L., y Goodwing, S. B. (1991). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology*, 81,1330-1336.
- Gabriel, J., Fernández, S., Plata, G., y Siles, M. (2011). Niveles de resistencia al tizón tardío en clones de papa del Centro Internacional de la Papa (CIP) evaluados en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 16(1),126-141.
- Gandía, H. F., Jiménez, A. M., Cabanes J., García, C. F., Escribano, J. (2005). Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7),6825-6830.
- Gazaryan, I. G., Lagrimini, L. M., Ashby, G. A., y Thorneley, R. N. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal*, 313(3),841-847.
- Giannopolitis, C. N. y Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2),309-314.
- Gilchrist, D. G. (1998). Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology*, 36,393-414.
- Gill, S. S. y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12),909-930.
- Goodwin, S. B., Drenth, A. y Fry, W. E. (1992). Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetics*, 22(2),107-11.

- Goodwin, S.B. y Drenth, A. (1997). Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology*, 87(10),992-999.
- Goss, E. M., Tabima, J. F., Cooke, D. E., Restrepo, S., Fry, W. E., Forbes, G. A., Grünwald, N. J. (2014). The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24),8791-8796.
- Govers, F., Drenth, A., y Pieterse C. M. J. (1997). 2 The Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* and Other Pathogenic Oomycota. En Carroll/Tudzynski (Ed.), *The Mycota V Part B Plant Relationships* (pp.17-36). Berlín, Alemania: Springer-Verlag.
- Grant, J. J. y Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease. *Plant Physiology*, 124,21-29.
- Groom, Q.J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N.J., y Jones, J. D. G. (1996). *RbohA*, a rice homologue of the mammalian *gpghphox* respiratory burst oxidase gene. *The Plant Journal*, 10, 515-522.
- Grun, S., Lindermayr C., Sell, S., y Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57,507-516.
- Grünwald, N. J., Flier, W. G., Sturbaum, A. K., Garay- Serrano, E., van der Bosch, T. B. N., Smart, C. D.,...Fry, W. E. (2001). Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathology*, 91,882-890.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbroek, K. y Schmelzer, E. (1998). Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in pars ley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95,8398-8403.
- Hakeem, K. R., Chandna, R., Ahmad, V., Ozturk, y M., Iqbal, M. (2012). Relevance of proteomic investigations in plant stress physiology. *A Journal of Integrative Biology*, 16(11),621-635.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (1996). Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*, 8,1773-1791.

- Harper, J. R. y Balke, N. E. (1981). Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oats roots by salicylic acid. *Plant Physiology*, 68(8),1349-1353.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2009). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1),14-25.
- He, Y., y Zhu, Z. J. (2008). Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum*, 52(4),792-795.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44(3),321-334.
- Hemm, M. R., Rider, S. D., Ogas, J., Murry, D. J., y Chapple, C. (2004). Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 38(5),765-778.
- Hijmans, R. J. y Spooner, D. M. (2001). Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, 88(11),2101-2112.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., y Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42(5),462-468.
- Holderbaum, D. F., Kon, T., Kudo, T., Guerra, M. P. (2010). Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *Horticultural Science*, 45(8),1150-1154.
- Holub, E. B., Beynon, J. L., y Crute, I. R. (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Pemnospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7, 223-239.
- Hong-xia, L. Zhi-yong, X., y Zeng-yan, Z. (2011). Changes in activities of antioxidant-related enzymes in leaves of resistant and susceptible wheat inoculated with *Rhizoctonia cerealis*. *Agricultural Sciences in China*, 10,526-533.

- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H.,...Chen, Z. (2010). Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4),1526-1538.
- Huang, R, Xia, R., Hu, L., Lu, Y., y Wang, M. (2007). Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae*, 113,166-172.
- Hyun, W. M., Yun, H. Y., Kim, Y. J., y Kim, H. S. (2011). Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiology*, 39(4),257-265.
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Inzé, D. y Van Montagu, M. (1995). Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6,153-158.
- James, W. C., Callbeck, L. C., Hodgson, W. A., y Shih, C. S. (1971). Evaluation of a method used to estimate loss in yield of potatoes caused by late blight. *Phytopathology*, 61,1471-1476.
- Jiang, S., Han, S., He, D., Cao, G., Fang, K., Xiao X., Yi, J., Wan, X., (2019). The accumulation of phenolic compounds and increased activities of related enzymes contribute to early defense against walnut blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 108,101433.
- Jin, Q., Yao, Y., Cai, Y., y Lin, Y. (2013). Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium*. *PLOS One* 8(4), e62352.
- Jones, D. H. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23(7),1349-1359.
- Juzepczuk, S.W. y S.M. Bukasov. (1929). A contribution to the question of the origin of the potato. Proceedings of USSR Congress of Genetics, *Plant and Animal Breeding*, 3,592-611.
- Juzepczuk, S.W. y S.M. Bukasov. (1936). Nuevas especies de *Solanum* de la Argentina. *Revista Argentina de Agronomía*, 3,225-239.

- Kamoun, S. (2003). Molecular genetics of phytopathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2(2),191-199.
- Kangasjärvi, S., Lepistö, A., Hännikäinen, K., Piippo, M., Luomala, E. M., Aro, E. M., y Rintamäki, E. (2008). Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal*, 412(2),275-285.
- Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J. y Traore, A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4(8),823-828.
- Keen, N.T. (2000). A Century of plant pathology: a retrospective view on understanding host-parasite interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 38,31-48.
- Kefeli, V.I., Kalevitch, M.V. y Borsari, B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2,13-18.
- Khan, W., Prithviraj, B., y Smith, D. L. (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *The Journal of Plant Physiology*, 160(5),485-492.
- Khodadadi, F., Tohidfar, M., Mohayeji, M., Dandekar, A. M., Leslie, C. A., Kluepfel, D. A., Vahdati, K. (2016). Induction of polyphenol oxidase in walnut and its relationship to the pathogenic response to bacterial blight. *Journal of the American Society for horticultural Science*, 141(2),199-124.
- Klessig, D. F. y Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*, 26(5),1439-1458.
- Kombrink, E. y Somssich, I. E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research*, 21,1-31.
- Koukol, J. y Conn, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *The Journal of Biological Chemistry*, 236,2692-2698.
- Kovtun, Y., Chiu, W-L, Tena, G., y Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in

- plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97,2940-2945.
- Kurozawa, C., y Paván, M. A. (2016). Doenças do tomateiro. Kimati, H; Amorim, L; Bergamin Filho, A; Camargo, LEA; Rezende JAM. (ed.), En *Manual de Fitopatología* pp. 820. San Pablo, BR. Editora Agronômica Ceres. v. 2,
- Kuzniak, E., y Sklodowska, M. (2005). Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta*, 222(1),192-200.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., y Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 198, 267-284.
- Lamb, C., y Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251-275.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T. y Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry*, 37,23-67.
- Lemos, M., Aliyu, M., y Hungerford, G. (2015). Influence of cooking on the levels of bioactive compounds in purple majesty potato observed via chemical and spectroscopic means. *Food Chemistry*, 173,462-467.
- León, J., Lawton, M. A., y Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 108(4),1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., y Lamb, C. J. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583-593.
- Li, L. y Steffens, J. C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2),239-247.

- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., y Feng Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087-26124.
- Liszkay, A., Kenk, B., y Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217(4), 658-667.
- Loake, G. y Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 466-472.
- Lu, H. (2009). Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signaling and Behavior*, 4(8), 713-717.
- MacDonald, M. J., D'Cunha, G. B. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(3), 273-282.
- Magbanua, Z. V., De Moraes, C. M., Brooks, T. D., Williams, W. P., y Luthe, D. S. 2007. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*?. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(6), 697-706.
- Mahajan, S. y Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2005), 139-158.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A., y Lamb, C. J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7802-7806.
- Mahmoud, H., El, K., Amgad, A. S., Yasser, E. I., y Younes, Y. M. (2019). Early production of reactive oxygen species coupled with an efficient antioxidant system play a role in potato resistance to late blight. *Tropical Plant Pathology*, 45, 44-55.
- Majeed, A., Muhammad, Z., Ullah, Z., Ullah, R., y Ahmad, H., (2017). Late blight of potato (*Phytophthora infestans*) I: Fungicides application and associated challenges. *Turkis Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5(3), 261-266.

- Makandar, R., Nalam, V. J., Lee, H., Trick, H. N., Dong, Y., y Shah, J. (2012). Salicylic acid regulates basal resistance to Fusarium head blight in wheat. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 25(3),431-439.
- Maksimovic, J. D., Zhang, J., Zeng, F., Živanovic, B. D., Shabala, L., Zhou, M., y Shabala, S. (2013). Linking oxidative and salinity stress tolerance in barley: can root antioxidant enzyme activity be used as a measure of stress tolerance?. *Plant Soil*, 365(1),141-155.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., y Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983),1002-1004.
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U. y Willats, W. G. T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5(178),1-12.
- Mandal, S., Mallick, N., y Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to Fusarium oxysporum F. Sp. Lycopersici in tomato. *Plant Physiology & Biochemistry*, 47(7),642-649.
- Martínez, M., Ruiz-Duenas, F. J., Guillen, F., y Martínez, A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, 237(2),424-432.
- Mayer, A. M. (1987). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26(1),11-20.
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? a review. *Phytochemistry*, 67(21),2318-2331.
- McInnis, S. M., Desikan, R., Hancock, J. T., y Hiscock, S. J. (2006). Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk?. *New Phytologist*, 172(2),221-228.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J. A., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., y Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250(4983),1004-1006.

- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Veberic, R., Stampar, F., Solar, A. (2011). Phenolic response in green walnut husk after the infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(3-4),159-165.
- Miller, A-F. (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett*, 586(5),585-595.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9),405-410.
- Miyagawa, Y., Tamoi, M., y Shigeoka, S. (2000). Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology*, 41(3),311-320.
- Mohammadi, M., y Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162(4),491-498.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., y Klessig, D.F. (2010). NO synthesis and signaling in plants-where do we stand? *Physiology Plant*, 138,372-383.
- Moriwaki, T., Yamamoto, Y., Aida, T., Funashi, T., Shishido, T., Asada, M., Motohashi, T. (2007) Overexpression of the *Escherichia coli* catalase kate, enhances tolerance to salinity stress in the transgenic indica rice cultivar, BR5. *Plant Biotechnology Reports*, 2,41-46.
- Mou, Z., Fan, W., y Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113,935-944.
- Naczek, M. y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054(1-2), 95-111.
- Naglaa, A. A., y Heba I. M. (2011). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology*, 11(5),1073-1077.

- Naton, B., Hahlbrock, K. y Schmelzer, E. (1996). Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiology*, 112(1),433-444.
- Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., y Kozik, E. U. (2012). Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease*, 96(1),4-17.
- Nürnberg, T., y Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends of Plant Science*, 6, 372-379.
- Orozco, C. M., Narvaez, V. J. y Ryan, C. (2001). Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Cell*, 13, 179-191.
- Ortiz, O., Winters, P., Y Fano, H. (1999). La Percepción de los Agricultores sobre el Problema del Tizón Tardío o Mancha (Phytophthora infestans) su Manejo: Estudio de Casos en Cajamarca, Perú. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 11,97-120.
- Osborn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8(10),1821-1831.
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., y del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40,521-530.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., y Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(1),1-16.
- Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F. K., Pinheiro-Margis, M., Penel, C., Dunand, C., y Skulachev, V. P. (2007). Prokaryotic origins of the peroxidase superfamily and organellar-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics*, 89, 567-579.

- Payyavula, R. S., Navarre, D. A., Kuhl, J. C., Pantoja, A., y Pillai, S. S. (2012). Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression. *BMC Plant Biology*, 12(39),1-17.
- Pérez, B. M, Ruiz, D. F J, Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M., Martínez, A. T. (2005). Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways; *Journal of Molecular Biology*, 354(2), 385-402.
- Peters, L. P., Carvalho, G., Vilhena, M. B., Creste, S., Azevedo, R. A., y Monteiro-Vitorello, C. B. (2017). Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and susceptible genotypes. *Planta*, 245(4),749-764.
- Pilon, M., Ravet, K., y Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(8),989-998.
- Piontek, K., Smith, A. T., y Blodig., W. (2001). Lignin peroxidase structure and function. *Biochemical Society Transactions*, 29,111-116.
- Pritsch, C., Vance, C. P.; Bushnell, W. R., Somers, D. A., Hohn, T. M., Muehlbauer, G. J. (2001). Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58(1),1-12.
- Qi, P. F., Johnston, A., Balcerzak, M.; Rocheleau, H., Harris, L.J., Long, X., Wei, Y. M., Zheng, Y. L. Ouellet, T. (2012). Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. *Fungal Biology*, 116(3),413-426.
- Radwan, D. E. M., Fayez, K. A., Mahmoud, S. Y., Hamad, A., y Lu, G. (2006). Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zucchini yellow mosaic virus infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69,172-181.
- Rahnama, H. y Ebrahimzadeh, H. (2006). Antioxidant Isozymes Activities in Potato Plants (*Solanum tuberosum* L.) Under Salt Stress. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 17(3),225-230.

- Raman, K. V., Grünwald, N. J., y W. E. Fry. (2000). Promoting international collaboration for potato late blight disease management. *Pesticide Outlook*, 11(5), 181-185.
- Rasmussen, C. B., Henriksen, A., Abelskov, K., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Hejgaard, J., y Welinder, K.G. (1997). Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP1, a new type of plant peroxidase. *Physiologia Plantarum*, 100(1), 102-110.
- Rauyaree, P., Choi, W., Fang, E., Blackmon, B., y Dean, R. (2001). Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology*, 2, 347-354.
- Reimers, P. J., Guo, A., y Leach, J. E. (1992). Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae pv oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology*, 99(3), 1044-1050.
- Ristaino, J. B., (2002). Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Microbes Infection*, 4(13), 1369-1377.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., y Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8(10), 1809-1819.
- Sánchez, R. G., Mercado, C. E., Peña, B. E., de la Cruz, R. H. y Pineda, G. E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12(2), 90-95.
- Scandalios, J. G. (2001). Molecular Responses to Oxidative Stress. In: Hawkesford M.J., Buchner P. (eds) *Molecular Analysis of Plant Adaptation to the Environment*. Springer Handbook Series of Plant Ecophysiology, vol 1. Springer, Dordrecht.
- Schmitz-Hoerner, R. y Weissenböck, G. (2003). Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry*, 64(1), 243-255.

- Segal, A. W., y Abo, A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(2), 43-47.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., y Dixon, K., (2000). Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *The Journal of Plant Growth Regulation*, 30,157-161.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., y Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* 5: 274. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>. ("en prensa").
- Sharma, I. y Travlos, I. S. (2012). Phosphate supply as a promoter of tolerance to arsenic in pearl millet. *International Journal of Plant Production*, 6(4),443-456.
- Sharma, I., Singh, R., y Tripathi, B.N., (2007). Biochemistry of arsenic toxicity and tolerance in plants. *Biochemical and Cellular Archives*, 7,165-170.
- Sharp, K. H., Mewies, M., Moody, P. C. E., y Raven, E. L. (2003). Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(4),303-307.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J. P., Raskin, I. (1995). Salicylic acid in rice. Biosynthesis, conjugation, and possible role. *Plant Physiology*, 108(2),633-639.
- Simons, T. J., y Ross, A. F. (1970). Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. *Phytopathology*, 60,383-384.
- Skulachev, V. P. (1998). Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Letters*, 423,275-280.
- Song, A., Xue, G., Cui, P., Fan, F., Liu, H., Yin, C., Liang, Y. (2016). The role of silicon in enhancing resistance to bacterial blight of hydroponic and soil-cultured rice. *Scientific Reports*, 6(1),1-13.
- Spychalla, J. P. y Desborough, S. L. (1990). Superoxide Dismutase, Catalase, and α -Tocopherol Content of Stored Potato Tubers. *Plant Physiology*, 3,1214-1218.

- Stadnik, M. J. y Buchenauer, H. (2000). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(1),25-34.
- Su, Y., Wang, Z., Xu, L., Peng, Q., Liu, F., Li, Z., y Que, Y. (2016). Early selection for smut resistance in sugarcane using pathogen proliferation and changes in physiological and biochemical indices. *Frontiers in Plant Science*, 7,1133.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). Metabolitos secundarios y defensa de las plantas. In Taiz, L., & Zeiger, E. (Eds.) *Fisiología vegetal* (3ed., pp. 530-580). D.L.: Universitat Jaume I. the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 288(1-2),129-138.
- Thipyapong, P. y Steffens, J. C. (1997). Tomato polyphenol oxidase: Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology*, 115(2),409-418.
- Thipyapong, P., Hunt, M. D., y Steffens, J. C. (2004). Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, 220(1),105-117.
- Thygesen, P. W., Dry, L. B., y Robinson, S. P. (1995). A Multigene Family That Exhibits Differential Expression Patterns. *Plant Physiology*, 109(2),525-531.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., y Simon, P. (2002). Analysis and expression of
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., y Dangl. J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141,373-378.
- Torres. B. M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138, 414-429.
- Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B. N., Anand, A., Mysore, K. S., y Bender, C. L. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in

- tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8),955-965.
- Valcarcel, J., Reilly, K., Gaffney, M., y O'Brien, N. (2015). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content in sixty varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in Ireland. *Potato Research*, 58(3),221-244.
- Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(1),49-127.
- Vance, C. P., Kirk, T. K., y Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18,259-288.
- Vanitha, C. S., Niranjana, R. S., y Umesha, S. (2008). Role of Phenylalanine Ammonia Lyase and Polyphenol Oxidase in Host Resistance to Bacterial Wilt of Tomato. *Journal of Phytopathology*, 157(9),552-557.
- Vaughn, K. C., Lax, A. R., y Duke, S. O. (1988). Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. *Physiologia plantarum*, 72,659-665.
- Verberne, C. M., Verpoorte, R., Bol, F. J. Mercado-Blanco, J. y Linthorst, M. J. H. (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, 18,779-783.
- Vernooij, B., Uknes, S., Ward, E., Ryals, J. (1994b). Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(2), 275-279.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., y Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47,177-206.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1),2-20.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., y Fuchigami, L. (2005). Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 130(2),167-173.
- Wastie, R. L. (1991). Breeding for resistance. D. S. Ingram y P. H. Williams. (ed.), *Phytophthora infestans: The cause of Late Blight of Potato. Advances in*

- Plant Pathology* (pp. 193-224). San Diego, CA, United States: Academic Press.
- Weydert, C. J., y Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1),51-66.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. y Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414(6863),562-565.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Van-Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *The EMBO Journal*, 16(16), 4806-4816.
- Winkel, S. B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3),218-223.
- Xavier Filha, M. S., Rodrigues, F. A., Domiciano, G. P., Oliveira, H. V., Silveira, P. R., y Moreira, W. R. (2011). Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology*, 40,28-38.
- Xu, X., y S. Tiang. (2008). Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 49(3),379-385.
- Yang, T. y Poovaiah, B. W. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6),4097-4102.
- Yoshida, K., Schuenemann, V. J., Cano, L. M., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., Krause, J. (2013). The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *Elife*, 2, e00731.
- Youssef, M. M., y Azooz, M. M., (2013). Biochemical studies on the effects of zinc and lead on oxidative stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in Okra (*Hibiscus esculentus* cv. Hassawi). *Science International*, 1(3),29-38.
- Yuen, J. E. y Andersson, B. (2013). What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe. *Plant Pathology*, 62(3),485-491.

- Zadoks, J. C. (2008). The potato murrain on the European continent and the revolutions of 1848. *Potato Research*, 51(1),5-45.
- Zamocky, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P.G., y Obinger, C., (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 525(2),131-144.
- Zapprometov, M. (1989). The formation of phenolic compounds in plant cell and tissue cultures and possibility of its regulation. *Advances in Cell Culture*, 7, 240-245.
- Zoteyeva, N., Chrzanowska, M., Flis, B., y Zimnoch-Guzowska, E. (2012). Resistance to Pathogens of the Potato Accessions from the Collection of N. I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *American Journal of Potato Research*, 89,277-293

ENZIMAS DE RESISTENCIA CONTRA EL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) EN ESPECIES SILVESTRES DE SOLANUM SPP

José Luis Hernández-Corral; Héctor Lozoya-Saldaña*; María Teresa Colinas-León; Efraim Contreras-Magaña.

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. MÉXICO. (*Autor responsable: picti87@gmail.com).

RESUMEN

El tizón tardío de la papa, causado por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont). De Bary, es la enfermedad mas devastadora de esa solanácea. No obstante, especies silvestres de *Solanum* contienen diversos niveles de resistencia genética. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el contenido y acción de diversos metabolitos en especies silvestres de papa, e identificar su posible asociación con la resistencia. Doce accesiones de *Solanum* y un testigo susceptible comercial, se expusieron a la infección natural del oomiceto en el Valle de Toluca, México. Se cuantificó la severidad de infección y la actividad y concentración de siete metabolitos involucrados en mecanismos de defensa de la planta. *Solanum demissum* y *S. guereorense* resultaron inmunes, seguidas por *S. pinnatisectum* y *S. microdontum*, que tuvieron resistencia intermedia, y en todos los casos con actividad enzimática superior y menor porcentaje de infección que el testigo. *S. pinnatisectum*, sin ser la mas resistente, tuvo la mayor actividad enzimática, compuestos fenólicos y ácido salicílico. No obstante, *S. demissum* y *S. guereorense* mostraron la mayor resistencia (100 %). Los coeficientes de correlación más altos ($p \leq 0.05$) se obtuvieron con AS/POX ($r=0.95487$), PAL/CAT ($r=0.91087$), AS/CAT ($r=0.93839$), POX/PPO ($r=0.96266$) y AS/INF $r= (0.90347)$. Se concluye que las accesiones con cierto grado de resistencia superaron al testigo (susceptible) en la síntesis y actividad de los metabolitos bajo estudio, aunque sin relación directa cuantitativa resistencia/síntesis entre especies, pues las inmunes no superaron en actividad a las medianamente resistentes.

Palabras clave adicionales: *Phytophthora infestans*, FEN, PAL, SOD, POX, CAT, PPO.

ABSTRACT

Potato late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont). De Bary, is the most devastating disease of this solanaceous. However, wild *Solanum* species have different levels of genetic resistance. The objective of this work was to quantify the content and action of several metabolites of wild potato species, and to identify their possible association with resistance. Twelve *Solanum* accessions and a commercial susceptible cultivar as control, were exposed to natural infection of the oomycete in the Toluca Valley, Mexico. Infection severity and activity and concentration of seven metabolites involved in the plant defense mechanisms were quantified. *Solanum demissum* and *S. guereorense* were immune, followed by *S. pinnatisectum* and *S. microdontum*, with intermediate resistance, and in all cases with higher enzymatic activity and lower infection percentage than the control. *S. pinnatisectum* was not the most resistant, but had the highest enzymatic activity, phenolic compounds and salicylic acid. However, *S. demissum* and *S. guereorense* showed the highest resistance (100 %). Significant correlations ($p \leq 0.05$), were found. The highest coefficients were obtained in AS-POX ($r=0.95487$), PAL-CAT ($r=0.91087$), AS-CAT ($r=0.93839$), POX-PPO ($r=0.96266$) and AS-INF $r= (0.90347)$. It is concluded that the accessions with some level of resistance overcame the susceptible control in synthesis and activity of the metabolites under study, although with no direct quantitative resistance/synthesis relationship among species, for the immune ones did not overcome the ones with intermediate resistance.

Additional keywords: *Phytophthora infestans*, FEN, PAL, SOD, POX, CAT, PPO.

INTRODUCCIÓN

El oomiceto *P. infestans*, es el causante del tizón tardío el cual reduce de manera significativa el rendimiento del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), generando pérdidas económicas que superan los 3.2 billones USD a nivel mundial (Haverkort, *et al.*, 2008). El número de cultivares de papa resistentes usados en la actualidad no han sido suficientes para reducir las pérdidas en el rendimiento, debido a la continua evolución de este patógeno (Zoteyeva, *et al.*, 2012). El Instituto de Investigación de Plantas N. I. Vavilov (Vavilov Institute of Plant Research, VIR de Rusia), alberga una de las más antiguas e importantes colecciones especies silvestres y variedades cultivadas *Solanum* del mundo. Por lo que la resistencia a tizón tardío encontrada en especies silvestres de

Solanum, juega un papel importante ya varía desde una resistencia parcial hasta completa inmunidad en algunas especies (Colon, *et al.*, 1995).

Las respuestas hipersensitivas (HRs) de la planta son inducidas principalmente por hongos, oomicetos, bacterias y virus, no obstante, pueden ser activadas por otros organismos. Las especies reactivas de oxígeno ROS como el oxígeno (O_2), anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH), se activan en la planta cuando inicia el proceso infectivo de un patógeno y son a menudo importantes para iniciar las respuestas hipersensitivas (HRs). Sin embargo, el daño que ROS puede causar a las células de la planta es aliviado por un sistema enzimático que está conformado principalmente por superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y polifenol oxidasa (PPO). Además, la planta sintetiza otros compuestos de defensa como fenoles (FEN), fenilalanina amonioliase (PAL) y ácido salicílico (AS), que juegan un papel importante contra el ataque de patógenos, estrés ambiental y desarrollo de la planta (Waszczak, *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que la actividad SOD incrementó en los genotipos *Solanum tuberosum*, *Solanum Chacoense* y *Solanum sparsipillium* los cuales fueron expuestos a *P. infestans* (Kumari, *et al.*, 2017). Además de que los genotipos resistentes presentaron alta actividad SOD y niveles elevados de H_2O_2 en comparación con los genotipos susceptibles (Kumari, *et al.*, 2017). Las peroxidasas III mejoran la producción de ROS ya que actúa como mediador de señales de agentes antimicrobianos y aumenta la producción de fitoalexinas (Kristensen, *et al.*, 1999). Existe un incremento en la actividad de las peroxidasas en respuesta a infecciones bacterianas, infección de hongos, virus y viroides (Hiraga, *et al.*, 2000). La sobreexpresión de CAT en tabaco o arroz (*Oryza sativa*) aumenta la tolerancia a sequía y estrés por salinidad (Moriwaki, *et al.*, 2007). PPO actúa contra patógenos mediante la hidroxilación de monofenoles a *o-difenoles* y oxida este compuesto a quinonas, las cuales son más tóxicas para los microorganismos que los fenoles (Gandía, *et al.*, 2005). Cabe mencionar que PPO y POX son enzimas multifuncionales que previenen ataques químicos y biológicos aumentando las barreras físicas y contra-atacando al patógeno mediante la producción de radicales libres (Passardi, *et al.*, 2005).

La presencia de compuestos fenólicos está estrechamente relacionada con las respuestas de defensa en las plantas ya que hay mayor resistencia contra hongos y patógenos (Vidhyasekaran, 1997). Mientras que la síntesis de fenoles y metabolitos secundarios se asocian con la resistencia/susceptibilidad del genotipo (Lozoya, *et al.*, 2007), siendo mayor en genotipos resistentes que en susceptibles (Dai, *et al.*, 1995). Sin embargo, la habilidad de un hongo patógeno para inducir resistencia sistémica adquirida (SAR) está determinada por la actividad PAL debido a su participación en el metabolismo de los fenoles, ruta de las fitoalexinas e inducción de la síntesis de ácido salicílico (Duba, *et al.*, 2019) este último es un señalador esencial involucrada en la resistencia sistémica de la planta (Chaman, *et al.*, 2003). El objetivo de la presente investigación fue cuantificar el contenido de fenoles totales (FEN) y ácido salicílico (SA) así como la actividad de las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD) y polifenol oxidasa (PPO) en accesiones silvestres de papa *Solanum tuberosum* spp.) obtenidas del Instituto Vavilov de Recursos Fitogenéticos (VIR) en respuesta al ataque del oomiceto *Phytophthora infestans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron doce accesiones de la colección del N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) y el testigo *Solanum tuberosum* var. Agatha. Durante el verano del 2019 se sembraron 20 individuos por accesión a partir de semilla botánica en charolas de 200 cavidades. La inoculación se llevó a cabo de manera natural en las parcelas del INIFAP-ICAMEX. Se realizaron cuatro muestreos a los 81, 88, 95 y 102 días después del trasplante. A partir de hojas maduras del dosel medio de la planta se colectaron 40 g de tejido fresco. La severidad de infección se determinó el día de cada muestreo con el método de (Jeger y Viljanen-Rollinson, 2001). Se estableció un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en una planta y las variables respuesta fueron la actividad SOD, CAT, PER, PPO, FEN, PAL y AS. Para cada muestreo se realizó un ANAVA y comparaciones de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS (Statistical analysis System, 9.0). Además, se llevó a cabo análisis de correlación entre accesión, metabolito y severidad de infección. Se elaboró polvo de acetona de acuerdo a la metodología de Alia-Tejacal *et al.*, (2002). A 40 g de foliolo se adicionaron 100 ml de acetona fría, se licuó por 30 segundos y se

filtró al vacío. Se repitió este proceso seis veces. El polvo se secó a temperatura ambiente, se registró el peso y se congeló para el posterior análisis enzimático.

La proteína soluble se determinó por el método de Branford (1976), 0.5 g de polvo de acetona se mezclaron con 5 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M (pH=7.1) frío. La mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 20 min, 0.1 ml del sobrenadante se adicionaron a 4.9 ml de la solución de Coomassie blue, se agitó y registró el incremento en la absorbancia a 595 nm. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con albumina de bovino.

La determinación de SOD se realizó con la metodología descrita por Beyer y Fridovich (1987). A 0.05 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se añadieron 5 ml de Buffer Fosfatos (0.01M, pH 7.8). La mezcla fue homogenizada en frío (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 s. Se centrifugó a 2,617 X g, con una temperatura de 4 °C durante 30 min (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). En la oscuridad se preparó una mezcla con: 81 ml de Buffer Fosfatos + EDTA (0.01M, pH 7.8), 4.5 ml de L-metionina, 3 ml de Nitrotetrazolium blue y 2.25 ml de Triton X-100. En tubos de rosca se añadieron 3 ml de la mezcla anterior y 0.5 ml de muestra, tres tubos más fueron tomados como blanco y se les añadió 3 ml de la mezcla y 0.5 µl de Buffer Fosfatos (0.1M, pH 7.8). Los tubos se agitaron y se les agregó 30 µl de riboflavina. Se sometieron a luz fluorescente durante siete minutos. El cambio de absorbancia se leyó a 560 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

Para la determinación CAT se homogenizaron 0.05 g de polvo de acetona con 5 ml de Tris-HCl frío, (0.1 Mm pH 8.5, 1 % polivinilpirrolidona) utilizando un homogeneizador T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA. Se centrifugó a 12,000 g durante 20 min, refrigerando a 4 °C. La actividad CAT se evaluó mediante el método descrito por Lück, citado por Blackwell, *et al.*, (1990). Se colocaron 3 ml de Tris-HCl 10 Mm y 0.1 ml de peróxido de hidrogeno 0.88 % en 100 Mm de Tris-HCl. Esta mezcla se colocó en el espectrofotómetro. La reacción inició al adicionar 0.1 ml e extracto crudo y se observó el cambio de asorbancia a 240 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

La actividad de la peroxidasa se determinó en base a la metodología de Flukey y Jen (1978). A partir de 0.05 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se adicionaron 5

ml de TRIS-HCl + PVP (0.1 M, pH 7.1, 1 % polivinilpirrolidona). Se homogenizo la mezcla en frío (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 s. Posteriormente fue centrifugada (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22,617 g, 4 °C durante 30 min. Se determinó la enzimática añadiendo 2.5 ml de TRIS-HCl (0.1 M, pH 7.1), 0.1 ml de Peróxido de hidrógeno (0.25 %), 0.25 ml de Guaiacol (0.1 M) y 0.15 ml de muestra. Tomando las lecturas a los 30, 60, 90 y 120 s a 470 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

La actividad PPO se evaluó por el método propuesto por Laminkara (1995) con modificaciones. Se pesaron 0.2 g de polvo de acetona con 5 ml de Tris-HCl frío (100 Mm pH 7.1), se homogenizó (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 s y se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22,617 g, 4 °C durante 20 min. El sobrenadante se utilizó para el ensayo, en el cual se evaluó el cambio de absorbencia a 420 nm. La mezcla de reacción consistió en 2 ml de catecol (60 Mm) + 0.05 ml del sobrenadante, se determinó el cambio de absorbencia en un minuto.

La determinación de fenoles totales se realizó mediante la metodología Folin-Ciocalteu descrita por Waterman y Mole (1994). Se agregaron 150 µl de cada extracto en tubos de fondo plano. Se agregaron 850 µl de agua destilada y se agitó. Se añadieron 7 ml de agua destilada y 500 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (2N), se dejaron reposar durante ocho minutos, se adicionó 1.5 ml de Carbonato de sodio (20 %), se mezcló y se dejó reposar por dos horas en completa oscuridad. Concluidas las dos horas las muestras se leyeron a 760 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

Para la determinación PAL se utilizó la metodología descrita por Martínez-Téllez y Lafuente (1997). A partir de 0.1 g de polvo de acetona se agregaron 5 ml de Buffer Tampón Borato-Sodio (0.1 M, pH 8.8, 1 % Polivinilpirrolidona) + Mercaptoetanol (0.12 %), se homogeneizó en frío (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA). La mezcla se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22,617 g, 4 °C durante 20 min. Se agregó sulfato de amonio (0.46 g por ml de solución) y se agitó. Los tubos fueron colocados a baño de hielo y se agitaron (Max Q 4450, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) durante 20 min a 15 °C y posteriormente se centrifugaron (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22,617 g, 4 °C durante 20 min. Para determinar la actividad PAL se utilizaron dos series de tubos, en la primera serie se

agregaron 4 ml de agua bidestilada (pH 7.7) y 2 ml de extracto, en la serie 2 se añadieron 3.4 ml de agua bidestilada (pH 7.7) y 2 ml de extracto, ambas series se mantuvieron a temperatura de 39 °C en baño maría. Se dejaron reposar por 10 min, a la serie 2 se le agregaron 600 µl de L-fenilalanina y se agitó. Las lecturas fueron tomadas a 290 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). Se dejaron reposar durante 2 hrs a temperatura de 39 °C y se tomaron lecturas nuevamente.

Para la cuantificación de AS se utilizó el método por colorimetría descrito por Warriar, *et al.*, (2013), con ligeras modificaciones. Se pesaron 50 mg de tejido vegetal fresco, se homogenizaron con 5 ml de agua destilada y se centrifugaron (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 25,000 g por 20 min a 7 °C. Los sobrenadantes de las muestras se colocaron en hielo hasta su medición. Se tomaron 100 µl del sobrenadante, y se agregaron 3.9 ml de cloruro férrico (Fe III), se agitó y midió la absorbancia de la solución a 540 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). Se elaboró una curva estándar y se disolvieron 100 mg de AS en 100 ml de agua destilada para obtener una solución madre a 1000 ppm. Se tomaron 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 y 5.5 ml de la solución madre, y se aforaron a 10 ml. Se midió la absorbancia de las soluciones en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 540 nm. Con los valores obtenidos se elaboró la curva de absorción y se obtuvo mediante la línea de tendencia, la fórmula para el cálculo de los µg de AS para luego obtener µg/g de tejido fresco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Severidad de infección

Se observó variación susceptibilidad/resistencia entre las accesiones evaluadas *S. demissum* y *S. guerreorensis* mostraron resistencia del 100 % contra *P. infestans*. En el día 95 *S. Pinnatisectum* y *S. microdontum* presentaron daños mayores a 50 %. El día 88 *S. verrucosum* y *S. berthaultii* presentaron daño mayor al 50 %. El resto de las accesiones presentaron daños del 100 % a los 102 días (figura 1A). La resistencia de *S. demissum*, *S. guerreorensis*, *S. pinnatisectum*, *S. microdontum*, *S. verrucosum* y *S. berthaultii* coincide con el estudio de Świeżyński y Zimnoch-Guzowska (2000) en el cual especies de *Solanum* presentaron resistencia a *P. infestans*.

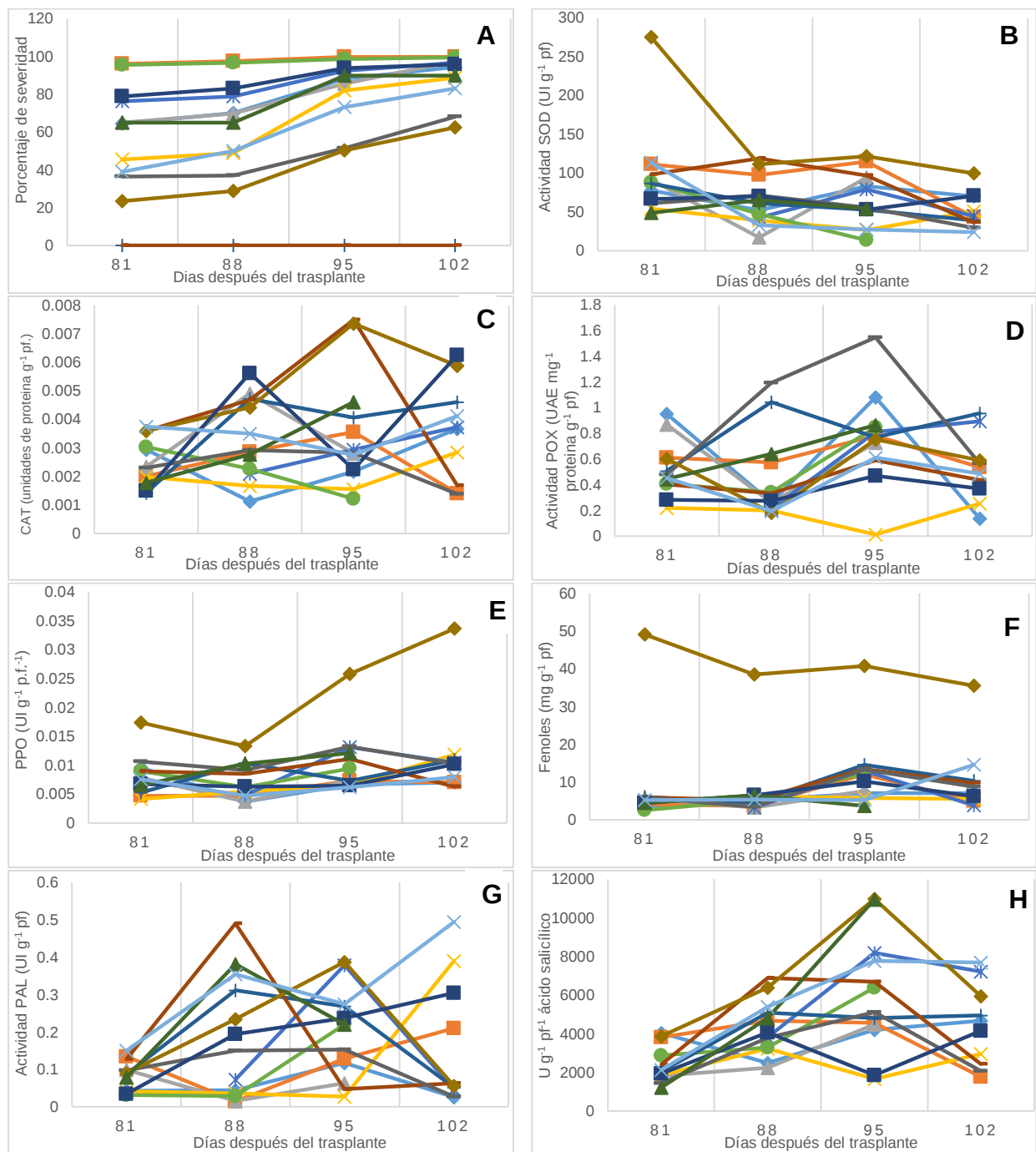


Figura 1. Severidad de infección (A) y actividad de los metabolitos cuantificados en las accesiones de *Solanum* bajo estudio. A, Infección; B, SOD; C, CAT; D, POX, E, PPO, F, FEN, G, PAL, H, AS.

Superóxido dismutasa

S. pinnatisectum registró la mayor actividad SOD. Sin embargo, *S. guerreorensis* y *Agatha* igualaron la actividad SOD de *S. pinnatisectum* en el día 88 y 95 (figura 1B). Por otra parte *S. Albicans*, *S. brevicaule*, *S. vernei*, disminuyeron actividad SOD en los días 88 y 95. *S. Chacoense*, tuvo la menor actividad. SOD incrementa su actividad debido a ROS protegiendo a las células del O_2^- , transformándolo en H_2O_2 y actuando directamente contra el patógeno (Vidhyassekaran, 1997). Lozoya *et al.*, (2010) mencionan que el incremento de actividad SOD en las especies silvestres *S. pinnatisectum*, *S. demissum*, *S. microdontum* es una medida de resistencia natural contra *P. infestans*, en cambio en especies susceptibles la actividad SOD es menor. Por otra parte, la desintoxicación de ROS en la planta depende de la síntesis y actividad SOD (Kliebenstein, *et al.*, 1998).

Catalasa

S. pinnatisectum y *S. guerreorensis* registraron el mayor contenido CAT y presentaron el mismo comportamiento los días 81, 88 y 95 (figura 1C). *S. stoloniferum*, *S. microdontum* y *S. demissum*, en el muestreo 2 y 4 incrementaron su actividad y en los muestreos 1 y 3 disminuyó. No obstante, a pesar del mismo comportamiento la actividad CAT en *S. stoloniferum* fue superior a *S. microdontum* y *S. demissum*. Por otra parte, *S. brevicaule*, *S. demissum*, y *S. verrucosum* estadísticamente presentaron la misma actividad CAT en los muestreos 2, 3 y 4 (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). Se ha demostrado que el incremento de la actividad CAT en plantas senescentes se debe al aumento de en la producción de radicales libres por el tejido senescente lo que origina una respuesta antioxidante que eleva la actividad CAT (Liang, *et al.*, 2003). En cuanto a las especies *S. pinnatisectum* y *S. guerreorensis* las cuales expresaron mayor actividad CAT Mohammadi *et al.*, (2020) inocularon hojas de papa con *P. infestans* y observaron que en las plantas con tratamiento de fosfito de potasio la actividad CAT aumentó 24 h después de la infección.

Peroxidasa

S. acaule, *S. albicans*, *agatha* y *S. pinnatisectum* mostraron la actividad POX más alta en el muestreo 1. *S. microdontum* y *S. demissum* fueron superiores a las demás accesiones en el muestreo 2. Las accesiones *S. brevicaule* y *S. demissum* en el muestreo 4 tuvieron una actividad POX superior al resto. Mientras que *S. acaule*, *S. berthaultii*, *S. guerreorensis* y *S. stoloniferum* fueron las que tuvieron la menor síntesis POX en el

muestreo 4. La mayoría de las accesiones mostraron un incremento de actividad POX en el muestreo 3 (figura 1D). La resistencia genética del hospedante determina el incremento de actividad de la POX ya que este enzima favorece el refuerzo de estructuras de defensa celular por medio de la lignificación de la pared celular y follaje dificultando el proceso de infección del patógeno (Goodman, *et al.*, 1986). Xiao *et al.*, (2019) encontraron que cinco proteínas peroxidadas involucradas en el metabolismo ROS incrementaron su actividad en la interacción *S. tuberosum* (cv. Sarpo Mira) /*P. infestans* lo que sugiere que la inducción del proceso oxidativo genera una interacción incompatible entre el cultivar de papa cv. Pastusa Suprema y *P. infestans* (Gaviria, *et al.*, 2019). El inicio del proceso oxidativo por la peroxidasa 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 (Lozoya, *et al.*, 2010). El O_2^- sufre una reducción, hay una reacción 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. Por lo que en el caso de las especies susceptibles a medida que las condiciones ambientales favorezcan el establecimiento del patógeno la actividad enzimática POX se ve reducida (Lozoya, *et al.*, 2010).

Polifenol oxidasa

La accesión con la mayor actividad PPO fue *S. pinnatisectum*. Sin embargo, en el muestreo 2 las accesiones *S. demissum*, *S. microdontum* y *S. vernei* tuvieron estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$) la misma actividad PPO que *S. pinnatisectum* (figura 1E). Las accesiones agatha, *S. albicans*, *S. berthaultii*, *S. stoloniferum* y *S. verrucosum* se comportaron de manera similar a lo largo de los cuatro muestreos. Ngadze, *et al.*, (2012) encontraron que los clones de papa con alta actividad PPO mostraron un menor grado de infección por *P. infestans*. Además, PPO cataliza la oxidación de fenoles a radicales libres los cuales pueden reaccionar con moléculas biológicas, creando un ambiente desfavorable para el desarrollo del patógeno. Por otro lado, Ngadze *et al.*, (2010) determinaron que los compuestos fenólicos y PPO por si solos no garantizan resistencia contra *Pectobacterium* como lo fue en el caso de la variedad de papa Montclare, la cual fue severamente afectada por este patógeno a pesar de tener una alta concentración de fenoles solubles totales. Estos resultados también concuerdan con lo

encontrado por Lojkowska y Holubowska, (1992) quienes reportaron un bajo nivel de tolerancia en cultivares de papa que tenían muchos compuestos fenólicos y PPO.

Fenoles totales

Respecto al contenido de fenoles totales *S. pinnatisectum* tuvo la mayor concentración de fenoles, Sin embargo, la concentración fue disminuyendo con el paso de los días. Esto es parecido a lo observado por Lozoya *et al.*, (2007) ya que encontraron que a mayor grado infección hubo aumento en la síntesis de fenoles, cuando se supone que esta relación es inversa. En cuanto a las demás accesiones el contenido de fenoles incremento en el muestreo 3 en *S. demissum*, *S. guerreorensis*, *S. brevicaulis*, *S. chacoensis*, y *S. microdontum*. Por otra parte, *S. acaule* mostró la menor concentración de fenoles (figura 1F). La deposición de compuestos fenólicos en las células de epidérmicas es un mecanismo general de resistencia en hojas de papa, pero no tiene ninguna relación con la resistencia a *P. infestans* (Subhani, *et al.*, 2014). A pesar de que todas las accesiones con excepción de *S. pinnatisectum* tuvieron un comportamiento muy similar en la síntesis de fenoles las accesiones resistentes *S. demissum*, *S. guerreorensis*, *S. pinnatisectum*, *S. microdontum*, *S. verrucosum* y *S. berthaultii* presentaron a lo largo de los cuatro muestreos una cantidad parecida de compuestos fenólicos a las accesiones no resistentes. Este comportamiento es parecido a lo investigado por Covarrubias *et al.*, (2006) donde la deposición de compuestos fenólicos fue superior en cultivares resistentes a *P. infestans*. También se encontró que además de las fitoalexinas y glicoalcaloides, los fenoles están involucrados en la resistencia Andreu *et al.*, (2001).

Fenilalanina amonioliasa

La actividad PAL varió a través del tiempo en las distintas accesiones evaluadas. En el día 95 *S. pinnatisectum* y *S. brevicaulis* mostraron la mayor actividad y para el día 102 la actividad PAL se redujo drásticamente en las accesiones *S. demissum*, *S. guerreorensis*, *S. pinnatisectum*, *S. acaule*, *S. brevicaulis* y *S. microdontum*, en cambio para *S. verrucosum*, *S. berthaultii*, *S. stoloniferum* y *agatha* incrementó la actividad (figura 1G). PAL es una enzima precursora de compuestos fenólicos, por lo que se espera su síntesis en plantas resistentes al ataque de patógenos, o de manera selectiva en presencia de agroquímicos (Winkel, 1999). PAL regularmente presenta mayor actividad o síntesis 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, 1990).

Ácido salicílico

S. pinnatisectum presentó el mayor contenido AS en los cuatro muestreos (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). En día 88 *S. guerreorensense* y *S. verrucosum* sintetizaron la misma cantidad de AS que *S. pinnatisectum* (figura 1H). Se ha demostrado que el contenido de ácido salicílico incrementa cuando los tejidos de la planta son infectados por patógenos (Wu, *et al.*, 1997). Además, AS participa de manera inmediata activando los diversos sistemas de señal en la planta, como NAD(P)H oxidasa, NO sintasa, MAP kinasa, entre otros, (Tarchevsky, 2002). Las rutas del ácido salicílico y ácido jasmónico son importantes en la defensa de las plantas de papa contra la infección de *P. infestans* (Halim, *et al.*, 2009).

Análisis de correlación

Se detectó significancia estadística ($p \leq 0.05$) entre especie, severidad de infección y metabolito. Sin embargo, a pesar de la alta correlación entre FEN/INF, AS/INF, POX/INF, PPO/INF la superioridad de infección en estas especies y en las que no hubo r significativa superó el 90 %, con excepción de *S. Microdontum* y *S. pinnatisectum* donde el % de infección fue de 68.33 % y 62.5 % respectivamente (cuadro 1).

Cuadro 1. Correlaciones significativas infección/metabolitos.

Especie	% infección final	Metabolito	r^*
<i>S. acaule</i>	94.39	FEN	0.882888**
<i>S. agata</i> **	100	-----	-----
<i>S. albicans</i>	97.5	AS	0.80032*
<i>S. berthaultii</i>	88.88	-----	-----
<i>S. brevicale</i>	96.85	POX	0.92038**
<i>S. chacoense</i>	99.62	-----	-----
<i>S. demissum</i>	0	SOD	-0.84848**
<i>S. guerreorensense</i>	0	-----	-----
<i>S. microdontum</i>	68.33	-----	-----
<i>S. pinnatisectum</i>	62.5	PPO	0.85652**
<i>S. stoloniferum</i>	96.03	-----	-----
<i>S. vernei</i>	90	AS	0.90347**
		POX	0.82545**
<i>S. verrucosum</i>	83.33	AS	0.90249**

(*) Coeficiente de Pearson, valor significativo de r . (**) *Solanum tuberosum*. Testigo susceptible.

En cuanto a *S. demissum*, se observó $r = -0.84848$ por lo que SOD posiblemente participó en la reducción de la infección. En cambio, para *S. guerreorensense* un r significativas

y presentó 0 % de infección. Lo que coincide con estudios realizados por Zoteyeva, et al. (2012) en el cual *S. demissum*, *S. guerreorensis*, *S. pinnatisectum* y *S. microdontum* presentaron resistencia total contra *P. infestans*. Por lo que la resistencia a tizón tardío en estas accesiones está basada en incrementos de otros compuestos, mecanismos, acciones o señales como lo son (lipoxigenasas, SOD'S, ácido jasmónico, AS, etileno, fosfolipasas, resistencia sistémica adquirida, hipersensibilidad, etc.) (Lozoya, et al., 2007).

Se detectaron correlaciones significativas ($p \leq 0.05$). Para el caso de los cultivares resistentes *S. demissum* se encontró significancia entre AS/CAT, AS/POX, CAT/POX, CAT/PPO, POX/PPO, para *S. guerreorensis* FEN/POX. Para el caso de los cultivares con resistencia parcial *S. microdontum* FEN/PPO, PAL/CAT, AS/POX, y *S. pinnatisectum* FEN/SOD, PAL/AS, AS/CAT (Cuadro 2).

La resistencia de las plantas a enfermedades está asociada con la activación de una amplia gama de respuestas de defensa las cuales reducen o detienen la infección en ciertas etapas de la interacción patógeno-hospedante. Estos mecanismos de defensa incluyen barreras físicas y químicas que interfieren con el establecimiento del patógeno en la planta. Los otros mecanismos de defensa inducidos por los ataques de patógenos son los enzimáticos (Vanitha, et al., 2009). Ya que la interacción entre el patógeno y la planta inducen algunos cambios en el metabolismo celular y la actividad de enzimas como PAL, POX, PPO, lipoxigenasa (LOX), SOD y β 1,3 glucanasa (Fukasawa-Akada, et al., 1996).

PAL es un precursor de compuestos fenólicos, se espera la síntesis de esta enzima en especies resistentes al ataque de patógenos, o selectivamente en presencia de agroquímicos (Winkel, 1999). Debido a que PAL es la enzima primaria en la ruta de los fenilpropanoides, la cual lidera la conversión de L-fenilalanina a ácido trans-cinámico a través de la eliminación del amoníaco. Por lo tanto, PAL es la enzima clave en la síntesis de diversos compuestos secundarios relacionados con la defensa de la planta como fenoles y lignina (Hemm, et al., 2004).

Cuadro 2. Correlaciones significativas entre metabolitos por especie de *Solanum*.

Especie	Correlaciones significativas y valor de r*
<i>S. acaule</i>	AS/CAT, 0.84965**
<i>Agata</i> **	-----
<i>S. albicans</i>	PAL/CAT, 0.9448**; PAL/POX, 0.82168*; PAL/PPO, 0.93636**; PAL/SOD, 0.87188*; CAT/POX, -0.9056**; CAT/PPO, 0.9916**; CAT/SOD, 0.9774**; POX/PPO, 0.88596**; POX/SOD, 0.86086**; PPO/SOD, 0.97824**
<i>S. berthaultii</i>	PAL/CAT, 0.83881**; PAL/PPO, 0.82053**
<i>S. brevicaule</i>	FEN/PAL, 0.98830**; FEN/SOD, 0.97487**; PAL/SOD, 0.98010**; AS/POX, 0.84344*; AS/PPO, 0.91856**; AS/POX, 0.84344*; AS/PPO, 0.91856**; POX/PPO, 0.88699**
<i>S. chacoense</i>	FEN/PAL, 0.91767**; FEN/AS, 0.93716**; FEN/POX, 0.89009**; FEN/SOD, 0.92064**; PAL/AS, 0.98966**; PAL/POX, 0.97759**; PAL/SOD, -0.81567*; AS/POX, 0.95734**; AS/SOD, -0.87955*
<i>S. demissum</i>	AS/CAT, 0.93839**; AS/POX, 0.86661**; CAT/POX, 0.93660**; CAT/PPO, 0.82013**; POX/PPO, 0.89051**
<i>S. guerreorens</i>	FEN/POX, 0.84362**
<i>S. microdontum</i>	FEN/PPO, 0.80511*; PAL/CAT, 0.91087**; AS/POX, 0.95487**
<i>S. pinnatisectum</i>	FEN/SOD, 0.87488**; PAL/AS, 0.87886**; AS/CAT, 0.82692**
<i>S. stoloniferum</i>	AS/CAT, 0.84671**;
<i>S. vernei</i>	AS/CAT, 0.95617**; AS/POX, 0.97848**; AS/PPO, 0.93887**; CAT/POX, 0.95106**; CAT/PPO, 0.90726**; POX/PPO, 0.96266**
<i>S. verrucosum</i>	AS/SOD, -0.90730**

(*) Coeficiente de Pearson, valor significativo de r. (**) *Solanum tuberosum*. Testigo susceptible. (ns) No significativo.

PPO es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles a quinonas. Además, los niveles PPO en la planta incrementan cuando está herida o infectada (Vanitha, *et al.*, 2009). La actividad PPO, POX, PAL, AS, CAT aumenta significativamente en tubérculos heridos e inoculados (Ngadze, *et al.*, 2012). Investigaciones indican que clones con alta actividad enzimática mostraron resistencia a la infección de *Phytophthora palmivora*. (Fry, 1982).

Conclusiones

Se cumplió con el objetivo de la cuantificación del contenido y/o actividad de algunos metabolitos relacionados con mecanismos de defensa de la planta en relación a la

infección natural por el tizón tardío. *Solanum demissum* y *S. guerreroense* no se infectaron; *S. pinnatisectum* y *S. microdontum* fueron intermedias en resistencia, y el resto de las especies fueron susceptibles. Las accesiones con cierto grado de resistencia superaron al testigo (susceptible) en la síntesis y actividad de los metabolitos bajo estudio, aunque sin relación directa cuantitativa resistencia/síntesis entre especies, pues las inmunes (*S. demissum* y *S. guerreroense*), no superaron en actividad a *S. pinnatisectum*, medianamente resistente.

LITERATURA CITADA

- Alia-Tejacal I; Colinas-León, M. T; Martínez-Damián, M. T; Soto-Hernández, M. R. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) durante poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8:263-271.
- Andreu, A; Oliva, C; Distel, S; Daleo, G. 2001. Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 44:1-9.
- Beyer, W. F. Jr; Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161(2): 559-566.
- Blackwell, R. D.; Murray, A. J. S.; Lea, P. J. 1990. Enzymes of photorespiratory carbon pathway. Academic Press. USA. 129-144 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54.
- Chaman, M. E; Copaja, S. V; Argandona, V. H. 2003. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(8):2227-2231.
- Colon, L; Budding, D; Keizer, L; Pieters, M. 1995. Components of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in eight South American *Solanum* species. *European Journal of Plant Pathology* 101: 441-456.

- Covarrubias, O. A. C; Douches, S. D; Hammerschmidt, R; daRocha, A; Kirk, W. W. 2006. Effect of Photoperiod and temperature on resistance against *Phytophthora infestans* in susceptible and resistant potato cultivars: Effect on deposition of structural phenolics on the cell wall and resistance to penetration. American Journal of Potato Research 83:325-34.
- Dai, G. H; Andary, C; Mondolot-Cosson, L; Boubais, D. 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). European Journal of Plant Pathology 101: 541-547.
- Dixon, R. A; y Harrison, J. M. 1990. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. Advances in Genetics 28:165-234.
- Duba, A; Goriewa-Duba, K; Wachowska, U; Głowacka, K; Wiwart, M. 2019. The Associations between Leaf Morphology, Phenylalanine Ammonia Lyase Activity, Reactive Oxygen Species, and Fusarium Resistance in Selected Species of Wheat with Different Ploidy Levels. Plants, 8(10): 360.
- Flurkey, W. H; Jen, J. J. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. Journal of Food Science 43(6):1828-1831.
- Fry, S. C. 1982. Isodityrosine a new amino acid from plant cell wall glycoprotein. Biochemical Journal 204(2): 449-455.
- Fukasawa-Akada, T; Kung, S; Watson, J. A. 1996. Phenylalanine ammonialyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. Plant Molecular Biology 30(4): 711-722.
- Gandía, H. F; Jiménez, A. M; Cabanes, J; García, C. F; Escribano, J. 2005. Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(7): 6825-6830.
- Gaviria, E. A; Patino, F. L; y Morales, G. J. 2019. Histological changes induced during the biotrophic phase of infection of three potato varieties by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Journal of Plant Protection Research 59(4): 465-478.
- Goodman, N. R; Kirán, Z; Wood, K. R. 1986. The Biochemistry and Physiology of the Plant Disease. University of Missouri Press. Columbia, MI, EEUU. 268 pp.

- Halim, V. A; Altmann, S; Ellinger, D; Eschen-Lippold, L; Miersch, O; Scheel, D; Rosahl, S. 2009. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant Journal*, 57(2): 230-42.
- Haverkort, A. J; Boonekamp, P.M; Hutten, R; Jacobsen, E; Lotz, L; Kessel, G; Visser, R; van der Vossen, E. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cis-genic modification. *Potato Research*, 51(1): 47-57.
- Hemm, M. R; Rider, S. D; Ogas, J; Murry, D. J; y Chapple, C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 38(5): 765-778.
- Hiraga, S; Ito, H; Yamakawa, H; Ohtsubo, N; Seo, S; Mitsuhashi, I,...Ohashi, Y. 2000. An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2): 210-216.
- Jeger, M. J; Viljanen, R. S. L. H. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 102(1): 32-40.
- Kliebenstein, D. J; Monde, R. A; Last, R. L. 1998. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118(2): 637-650.
- Korgan, S; Wolski, A. E; Cicore, P; Suárez, P; Capezio, S; Huarte, A. M; Andreu, B. A. 2010. *Solanum tarijense* reaction to *Phytophthora infestans* and the role of plant defence molecules. *Plant Breeding*, 130(2): 231-236.
- Kristensen, B. K; Bloch, H; Rasmussen, S. K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant physiology*, 20(2): 501-512.
- Kumar, A; Pundhir, V. S; Gupka, K. C. 1991. The role of phenols in potato tuber resistance against soft rot by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Potato Research* 34: 9-16.
- Kumari, A; Anil, V. S; Krishnaprasad, B. T. 2017. *Phytophthora infestans* induced defense response in calli of wild and cultivated potato genotypes: Pathogen induced cell death in cultures - a marker for resistance. *Plant Science Today* 4(3): 105-120.

- Lamikanra, O. 1995. Enzymatic browning of Muscadine grapes products. En C. L. Lee, y J. R. Whitaker. (Eds.), Enzymatic Browning and its Preventions, Washington, D.C., USA: ACS. (pp. 166-177).
- Liang, Y; Hu, F; Yang, M; Yu, J. 2003. Antioxidative defenses and water deficit-induced oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) growing on non-flooded paddy soils with ground mulching. *Plant Soil* 257(2): 407-416.
- Lojkowska, E; Holubowska, M. 1992. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Journal of Phytopathology* 136(4): 319-328.
- Lozoya, S. H; Juárez, C. A; León, C. M. T; Bamberg, J. 2010. Activación enzimática de especies de *Solanum* contra *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary). *Interciencia*, 35(8): 586-591.
- Lozoya, S. H; Rivera, H. R; Colinas, L. M. T. 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). *Agrociencia* 41(4): 479-489.
- Martínez-Téllez, M. A; Lafuente, M. T. 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology* 150: 674-678.
- Mauch-Mani, B; Slusarenko, A. J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*, 8: 203-212.
- Mohammadi, A. M; Han, X; Zhang, Z; Xi, Y; Boorboori, M; Wang-Pruski, W. 2020. Phosphite Application Alleviates *Pythophthora infestans* by Modulation of Photosynthetic and Physio-Biochemical Metabolites in Potato Leaves. *Pathogens*, 9(3):170.
- Moriwaki, T; Yamamoto, Y; Aida, T; Funashi, T; Shishido, T; Asada, M; Motohashi, T. 2007. Overexpression of the *Escherichia coli* catalase kate, enhances tolerance to salinity stress in the transgenic indica rice cultivar, BR5. *Plant Biotechnology Reports* 2: 41-46.

- Ngadze, E; Coutinho, T. A; van der Waals, J. E. 2010. First report of soft rot of potatoes caused by *Dickeya dadantii* in Zimbabwe. *Plant Disease* 94(10): 1263.
- Ngadze, E; Icishahayo, D; Coutinho, T. A; Van der Waals, J. E. 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease* 96:186-192.
- Passardi, F; Cosio, C; Penel, C; Dunand, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army Knife. *Plant Cell Reports* 24(5): 255-265.
- Subhani, N. M; Sahi, T. S; Rehman, A; Wakil, W. 2014. Effect of late blight caused by *Phytophthora infestans* on phenolic contents of potato advanced lines/cultivars. *Pakistan Journal of Phytopathology* 26(02): 213-218.
- Świeżyński, K. M; Zimnoch-Guzowska, E. 2000. Breeding potato cultivars with tubers resistant to *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 44: 97-117.
- Tarchevsky, I. A. 2002. *Signal'nye sistemy kletok rastenii* (Signal Transduction Pathways of Plant Cells), Moscow: Nauka, 2002.
- Vanitha, S. C; Niranjana, S. R; Umesha, S. 2009. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 157(9): 552-557.
- Vidhyasekaran, P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. Molecular Biology and Host Defense Mechanisms*. Dekker. Nueva York, EEUU. 553 pp.
- Warrier, R. R; Paul, M; Vineetha, M. V. 2013. Estimation of salicylic acid in eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology* 3(1-2): 90-97.
- Waszczak, C; Carmody, M; Kangasjärvi, J. 2018. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69(1): 209-236.
- Waterman, P. G; Mole, S. 1994. *Analysis on phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Winkel, S. B. 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107(1): 142-149.
- Wu, H; Echt, C. S; Popp, M. P; Davis, J. M; 1997. Molecular Cloning, Structure and Expression of an Elicitor-Inducible Chitinase Gene from Pine Trees. *Plant Molecular Biology* 33(6): 979-987.

- Xiao, C; Gao, J; Zhang, Y; Wang, Z; Zhang, D; Chen, Q; Ye, X; Xu, Y; Yang, G; Yan, L; Cheng, Q; Chen, J; Shen, Y. 2019. Quantitative proteomics of potato leaves infected with *Phytophthora infestans* provides insights into coordinated and altered protein expression during early and late disease stages. International Journal of Molecular Science 20(1):136.
- Zoteyeva, N; Chrzanowska, M; Flis, B; Zimnoch-Guzowska, E. 2012. Resistance to Pathogens of the Potato Accessions from the Collection of N. I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). American Journal of Potato Research 89: 277-293.

Apéndices

Comparación de medias

Cuadro 3. Comparación de medias para fenoles totales.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	3.6149 bc ^z	5.1241 bcd	7.138 de	7.0686 de
<i>S. t. var Agatha</i>	4.0892 bc	3.7373 cde	5.872 e	4.9460 ef
<i>S. albicans</i>	5.7100 bc	3.3325 e	7.672 ed	
<i>S. berthaultii</i>	4.3961 bc	6.3185 b	5.872 e	5.5674 ef
<i>S. brevipaule</i>		3.3493 e	13.074 bc	3.8356 f
<i>S. chacoense</i>	2.6497 c	5.3351 bc	12.403 bc	
<i>S. demissum</i>	6.1021 b	4.5176 cde	14.597 b	10.4076 c
<i>S. guerreoreense</i>	5.9348 bc	5.2176 bc	13.459 bc	9.8353 c
<i>S. microdontum</i>	5.9348 bc	3.5044 de	13.335 bc	8.8371 cd
<i>S. pinnatisectum</i>	49.1613 a	38.4592 a	40.777 a	35.5784 a
<i>S. stoloniferum</i>	4.4629 bc	6.6155 b	10.242 cd	6.2192 ef
<i>S. vernei</i>	4.4998 bc	6.4914 b	3.376 e	
<i>S. verrucosum</i>	5.3003 bc	5.4132 bc	5.276 e	14.6685 b
DMSH	3.3871	1.6918	3.9417	2.3924

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 4. Comparación de medias para fenilalanina amonioliada.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	0.04303 cd ^z	0.04452 ef	0.11835 efg	0.02691 d
<i>S. t. var Agatha</i>	0.13469 ab	0.01524 f	0.12925 def	0.21079 c
<i>S. albicans</i>	0.09975 abc	0.01704 f	0.06294 efg	
<i>S. berthaultii</i>	0.04211 cd	0.03684 ef	0.02803 g	0.39030 ab
<i>S. brevipaule</i>		0.07382 ef	0.37931 a	0.04821 d
<i>S. chacoense</i>	0.03162 d	0.02934 f	0.22130 bcd	
<i>S. demissum</i>	0.08831 abcd	0.31267 bc	0.26867 b	0.05214 d
<i>S. guerreoreense</i>	0.12759 ab	0.49118 a	0.04810 fg	0.06393 d
<i>S. microdontum</i>	0.09752 abcd	0.15043 de	0.15364 cde	0.02794 d
<i>S. pinnatisectum</i>	0.09101 abcd	0.23442 cd	0.38767 a	0.05582 d
<i>S. stoloniferum</i>	0.03522 cd	0.19482 cd	0.23819 bc	0.30542 bc
<i>S. vernei</i>	0.07920 bcd	0.38269 ab	0.22108 bcd	
<i>S. verrucosum</i>	0.15113 a	0.36446 b	0.27473 b	0.49498 a
DMSH	0.0661	0.12	0.0948	0.1157

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 5. Comparación de medias para polifenol oxidasa.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	0.009664 bc ^z	0.003697 e	0.0066475 d	0.007022 b
<i>S. t. var Agatha</i>	0.004776 de	0.004693 de	0.0073676 cd	0.007073 b
<i>S. albicans</i>	0.007904 bcde	0.003744 e	0.0073199 cd	
<i>S. berthaultii</i>	0.004168 e	0.005465 cde	0.0066233 d	0.011862 b
<i>S. brevicaule</i>		0.004796 de	0.0131121 b	0.010506
<i>S. chacoense</i>	0.008967 bcd	0.006222 bcde	0.0094507 bcd	
<i>S. demissum</i>	0.005273 cde	0.010367 ab	0.0073174 cd	0.010923 b
<i>S. guerrerorensis</i>	0.008978 bcd	0.008539 bcd	0.0110846 bc	0.006306 b
<i>S. microdontum</i>	0.010691 b	0.009184 abc	0.0132549 b	0.010293 b
<i>S. pinnatisectum</i>	0.017390 a	0.013294 a	0.0258440 a	0.033665 a
<i>S. stoloniferum</i>	0.006806 bcde	0.006296 bcde	0.0065156 d	0.010209 b
<i>S. vernei</i>	0.006603 bcde	0.010282 ab	0.0121053 b	
<i>S. verrucosum</i>	0.007630 bcde	0.004722 de	0.0062114 d	0.007929 b
DMSH	0.0047	0.0042	0.0038	0.0075

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 6. Comparación de medias para peroxidasa.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	0.95147 a ^z	0.26457 c	1.0821 b	0.14041 e
<i>S. t. var Agatha</i>	0.61130 abc	0.57676 b	0.7836 cb	0.53942 cd
<i>S. albicans</i>	0.87120 ab	0.26360 c	0.7294 bc	
<i>S. berthaultii</i>	0.22124 d	0.20154 c	0.0140 d	0.25406 de
<i>S. brevicaule</i>		0.21322 c	0.8122 bc	0.89586 ab
<i>S. chacoense</i>	0.40912 cd	0.34271 c	0.8493 cb	
<i>S. demissum</i>	0.51008 bcd	1.04292 a	0.7701 cb	0.95876 a
<i>S. guerrerorensis</i>	0.40626 cd	0.33435 c	0.5923 c	0.43688 cde
<i>S. microdontum</i>	0.47962 cd	1.19597 a	1.5478 a	0.56837bcd
<i>S. pinnatisectum</i>	0.60302 abcd	0.18315 c	0.7526 bc	0.59238 cd
<i>S. stoloniferum</i>	0.28445 cd	0.27398 c	0.4704 c	0.37201 cde
<i>S. vernei</i>	0.44536 cd	0.64015 b	0.8679 bc	
<i>S. verrucosum</i>	0.45567 cd	0.19593 c	0.6112 c	0.48925 cd
DMSH	0.3855	0.2047	0.4247	0.3304

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 7. Comparación de medias para catalasa.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	0.0029471 abc ^z	0.0011346 d	0.0021746 cd	0.0036772 bcde
<i>S. t. var Agatha</i>	0.0020192 bc	0.0028662 bcd	0.0035675 bd	0.0014116 e
<i>S. albicans</i>	0.0023506 abc	0.0049164 ab	0.0028148 bcd	
<i>S. berthaultii</i>	0.0019978 bc	0.0016747 d	0.0015526 d	0.0028561 cde
<i>S. brevipila</i>		0.0021096 cd	0.0029510 bcd	0.0037242 bcd
<i>S. chacoense</i>	0.0030355 abc	0.0022711 cd	0.0012236 d	
<i>S. demissum</i>	0.0014313 c	0.0047249 abc	0.0040681 bc	0.0046073 abc
<i>S. guerreorensis</i>	0.0035992 ab	0.0046854 abc	0.0074861 a	0.0016957 de
<i>S. microdontum</i>	0.0023142 abc	0.0029359 bcd	0.0028393 bcd	0.0013929 e
<i>S. pinnatisectum</i>	0.0036068 ab	0.0044177 abc	0.0073680 a	0.0058789 ab
<i>S. stoloniferum</i>	0.0014997 c	0.0056282 a	0.0022596 cd	0.0062598 a
<i>S. vernei</i>	0.0017778 c	0.0027703 bcd	0.0046104 b	
<i>S. verrucosum</i>	0.0037556 a	0.0035096 abcd	0.0027526 bcd	0.0041260 abc
DMSH	0.0017	0.0026	0.0020	0.0023

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 8. Comparación de medias para ácido salicílico.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	4033.2 a	2503.5 ef	4196.5 e	4681.1 bc
<i>S. t. var Agatha</i>	3830.0 ab	4665.1 cd	4576.2 de	1764.0 e
<i>S. albicans</i>	1825.3 cde	2245.3 f	4492.5 de	
<i>S. berthaultii</i>	1866.6 cde	3241.7 def	1651.7 f	2973.9 cde
<i>S. brevipila</i>		3827.3 cdef	8199.7 b	7236.3 a
<i>S. chacoense</i>	2872.0 bc	3285.1 def	6400.2 bcd	
<i>S. demissum</i>	2060.5 cde	5095.5 bc	4812.9 cde	4943.5 bc
<i>S. guerreorensis</i>	2401.8 cd	6878.7 a	6690.9 bc	2430.5 de
<i>S. microdontum</i>	1433.8 de	3800.2 cdef	5125.9 cde	2083.7
<i>S. pinnatisectum</i>	3870.6 ab	6406.4 ab	10981.1 a	5946.8 ab
<i>S. stoloniferum</i>	1939.2 cde	4058.6 cde	1850.8 f	4147.7 bcd
<i>S. vernei</i>	1228.7 e	4826.1 bcd	10949.6 a	
<i>S. verrucosum</i>	2132.1 cde	5391.5 abc	7784.5 b	7687.8 a
DMSH	1114.3	1710.6	1923.7	2064.9

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 9. Comparación de medias para superóxido dismutasa.

Especie	Días después del trasplante			
	81	88	95	102
<i>S. acaule</i>	77.56 bc	52.284 cd	83.291 bc	70.101 bc
<i>S. t. var Agatha</i>	111.18 b	98.054 ab	115.124 ab	43.108 de
<i>S. albicans</i>	91.31 bc	17.643 d	94.222 ab	
<i>S. berthaultii</i>	54.14 c	39.505 cd	27.108 de	50.727 bc
<i>S. brevicaule</i>		42.618 cd	79.125 bc	44.938 bcd
<i>S. chacoense</i>	88.01 bc	47.716 cd	13.804 e	
<i>S. demissum</i>	87.06 bc	61.539 bc	52.820 cd	39.249 cd
<i>S. guerrerorensis</i>	98.36 bc	119.329 a	96.717 ab	36.508 cd
<i>S. microdontum</i>	61.49 bc	71.739 bc	55.886 cd	29.416 cd
<i>S. pinnatisectum</i>	274.96 a	111.169 a	122.115 a	99.527 a
<i>S. stoloniferum</i>	66.92 bc	70.556 bc	53.040 cd	71.209 b
<i>S. vernei</i>	49.11 c	65.549 bc	54.201 cd	
<i>S. verrucosum</i>	113.49 b	33.183. cd	27.588 de	24.069 d
DMSH	51.818	38.864	36.032	26.463

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).
DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Análisis de varianza

Cuadro 10. Análisis de varianza para fenoles totales.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	7267.835994	660.712363	350.79*	<0.0001
Error	36	67.804990	1.883472		
Corrected	47	7335.640985			
Total					
CV	16.16866				
88 ddt					
Especies	12	4220.718225	351.726519	763.30*	<0.0001
Error	39	17.971116	0.460798		
Corrected	51	4238.689340			
Total					
CV	9.058774				
95 ddt					
Especies	12	4142.274055	345.189505	138.00*	<0.0001
Error	39	97.550970	2.501307		
Corrected	51	4239.825025			
Total					
CV	12.88140				
102 ddt					
Especies	9	3115.290581	346.143398	351.87*	<0.0001
Error	30	29.511511	0.983717		
Corrected	39	3144.802092			
Total					
CV	9.272555				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Cuadro 11. Análisis de varianza para fenilalanina amonioliase.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	0.05412012	0.00492001	9.75*	<0.0001
Error	24	0.01211337	0.00050472		
Corrected	35	0.06623349			
Total					
CV	26.40018				
88 ddt					
Especies	12	0.96037100	0.08003092	48.91*	<0.0001
Error	26	0.04254254	0.00163625		
Corrected	38	1.00291354			
Total					
CV	22.40091				
95 ddt					
Especies	12	0.49476539	0.04123045	40.41*	<0.0001
Error	26	0.02652657	0.00102025		
Corrected	38	0.52129195			
Total					
CV	16.40450				
102 ddt					
Especies	9	0.80328959	0.08925440	55.77*	<0.0001
Error	20	0.03200745	0.00160037		
Corrected	29	0.83529704			
Total					
CV	23.86286				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Cuadro 12. Análisis de varianza para polifenol oxidasa.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	0.00027088	0.00002463	17.76*	<0.0001
Error	12	0.00001664	0.00000139		
Corrected	23	0.00028752			
Total					
CV	14.29648				
88 ddt					
Especies	12	0.00021839	0.00001820	15.96*	<0.0001
Error	13	0.00001483	0.00000114		
Corrected	25	0.00023322			
Total					
CV	15.20626				
95 ddt					
Especies	12	0.00069408	0.00005784	62.87*	<0.0001
Error	13	0.00001196	0.00000092		
Corrected	25	0.00070604			
Total					
CV	9.385395				
102 ddt					
Especies	9	0.00115036	0.00012782	35.57*	<0.0001
Error	10	0.00003593	0.00000359		
Corrected	19	0.00118629			
Total					
CV	16.37122				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Cuadro 13. Análisis de varianza para peroxidasa.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	1.01227741	0.09202522	9.76*	<0.0001
Error	12	0.11313183	0.00942765		
Corrected	23	1.12540924			
Total					
CV	18.64608				
88 ddt					
Especies	12	2.67533862	0.22294489	84.15*	<0.0001
Error	13	0.03444128	0.00264933		
Corrected	25	2.70977990			
Total					
CV	11.68003				
95 ddt					
Especies	12	2.87807151	0.23983929	21.04*	<0.0001
Error	13	0.14819282	0.01139945		
Corrected	25	3.02626433			
Total					
CV	14.04427				
102 ddt					
Especies	9	1.17216271	0.13024030	18.69*	<0.0001
Error	10	0.06967312	0.00696731		
Corrected	19	1.24183583			
Total					
CV	15.90703				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Cuadro 14. Análisis de varianza para catalasa.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	0.00001538	0.00000140	7.67*	<0.0001
Error	12	0.00000219	0.00000018		
Corrected	23	0.00001757			
Total					
CV	16.89033				
88 ddt					
Especies	12	0.00004728	0.00000394	8.95*	<0.0001
Error	13	0.00000572	0.00000044		
Corrected	25	0.00005300			
Total					
CV	19.76035				
95 ddt					
Especies	12	0.00009289	0.00000774	31.43*	<0.0001
Error	13	0.00000320	0.00000025		
Corrected	25	0.00009609			
Total					
CV	14.12579				
102 ddt					
Especies	9	0.00005481	0.00000609	18.17*	<0.0001
Error	10	0.00000335	0.00000034		
Corrected	19	0.00005816			
Total					
CV	16.24814				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Cuadro 15. Análisis de varianza para para ácido salicílico.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	31132035.80	2830185.07	19.75*	<0.0001
Error	24	3438376.26	143265.68		
Corrected	35	34570412.06			
Total					
CV	15.40012				
88 ddt					
Especies	12	70330965.14	5860913.76	17.63*	<0.0001
Error	26	8641040.16	332347.70		
Corrected	38	78972005.29			
Total					
CV	13.32941				
95 ddt					
Especies	12	311438381.0	25953198.4	61.75*	<0.0001
Error	26	10927970.3	420306.6		
Corrected	38	322366351.3			
Total					
CV	10.84516				
102 ddt					
Especies	9	119730509.3	13303389.9	26.08*	<0.0001
Error	20	10201113.1	510055.7		
Corrected	29	129931622.4			
Total					
CV	16.27007				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Cuadro 16. Análisis de varianza para para superóxido dismutasa.

FUENTE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
81 ddt					
Especies	11	78044.49745	7094.95431	38.61*	<0.0001
Error	12	2209.09927	183.75827		
Corrected	23	80249.59672			
Total					
CV	13.86082				
88 ddt					
Especies	12	22230.64521	1852.55377	19.41*	<0.0001
Error	13	1240.97589	95.45968		
Corrected	25	23471.62110			
Total					
CV	15.28665				
95 ddt					
Especies	12	28093.29093	2341.10758	28.53*	<0.0001
Error	13	1066.70097	82.05392		
Corrected	25	29159.99190			
Total					
CV	13.45750				
102 ddt					
Especies	9	9532.694932	1059.188326	23.70*	<0.0001
Error	10	446.860700	44.686070		
Corrected	19	9979.555632			
Total					
CV	13.13595				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$.

Correlaciones

Cuadro 17. Coeficientes de correlación y nivel de significancia entre especies, enzimas y severidad de infección.

<i>S. acaule</i>								
ENZIMA	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	0.4323	0.31779	0.1703	-0.14817	-0.31638	0.2126	0.882888*
		<0.0945	<0.2304	<0.5283	<0.5839	<0.2325	<0.4292	<0.0001
PAL		1	0.08374	-0.31517	0.70808	-0.06727	0.54766	0.26538
			<0.7578	<0.2344	<0.0021	<0.8045	<0.0281	<0.3205
AS			1	0.84965*	0.22023	0.63944	0.71232	0.57634
				<0.0001	0.4124	0.0076	<0.0020	<0.0194
CAT				1	-0.04595	0.71544	0.46912	0.40827
					0.8658	0.0018	<0.0668	<0.1164
POX					1	0.51358	0.76495	-0.21602
						<0.0419	<0.0006	<0.4217
PPO						1	0.69018	-0.11655
							<0.0031	0.06673
SOD							1	0.30964
								<0.2432
INF								1
<i>Agata</i>								
FEN	1	0.1784	0.24542	0.64628	0.6032	0.68473	0.33797	0.50565
		<0.5087	<0.3596	<0.0068	<0.0134	<0.0034	<0.2004	<0.0457
PAL		1	-0.755	-0.52457	-0.09278	0.57341	-0.52529	0.38724
			<0.0007	<0.0370	<0.7325	<0.0202	<0.0367	<0.1384
AS			1	0.79233	0.52356	-0.34576	0.78766	-0.31704
				<0.0003	<0.0374	<0.1896	<0.0003	<0.2315
CAT				1	0.56812	0.11561	0.63019	0.04876
					<0.0217	<0.06698	<0.0089	<0.8577
POX					1	0.2604	0.27747	0.19149
						<0.3300	<0.2981	<0.4774
PPO						1	-0.30004	0.75595
							<0.2589	<0.0007
SOD							1	-0.33419
								<0.2058
INF								1

Continuación cuadro 17...

ALBICANS								
ENZIMA	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	0.53442	0.5652	-0.71738	-0.72269	0.73881	0.80321^{ns}	0.4758
		<0.0735	<0.0555	<0.0086	<0.0079	<0.0061	<0.0017	<0.1179
PAL		1	-0.08373	-0.9448*	0.82168	0.93636*	0.87188	-0.1031
			<0.7959	<0.0001	<0.0010	<0.0001	<0.0002	<0.7498
AS			1	-0.18921	0.0721	0.19541	0.37623	0.80032^{ns}
				<0.5559	0.8238	<0.5428	<0.2281	<0.0018
CAT				1	-0.9056*	-0.9916*	-0.9774*	-0.0919
					<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.7764
POX					1	0.88596*	0.86086*	-0.0382
						<0.0001	<0.0001	<0.9060
PPO						1	0.97824*	0.11332
							<0.0001	<0.7258
SOD							1	0.25089
								<0.4315
INF								1
<i>S. berthaultii</i>								
FEN	1	0.00174	0.46737	-0.07374	-0.22242	0.05535	-0.37783	0.25677
		<0.9949	<0.0679	<0.7861	<0.4077	<0.8387	<0.1491	<0.3371
PAL		1	0.43292	0.83881*	0.50084	0.82053*	-0.76707	0.64003
			<0.0939	<0.0001	<0.0481	<0.0001	<0.0005	<0.0076
AS			1	0.32149	0.61815	0.35846	-0.73018	-0.03116
				<0.2247	0.0107	<0.1728	<0.0013	<0.9088
CAT				1	0.53157	0.44361	-0.53041	0.40173
					<0.0341	<0.0852	<0.0345	<0.1230
POX					1	0.26598	-0.48247	-0.299
						<0.3194	<0.0582	<0.2606
PPO						1	0.70751	0.7474
							<0.0022	<0.0009
SOD							1	-0.45908
								<0.0737
INF								1

Continuación cuadro 17...

<i>S. brevicaula</i>								
ENZIMA	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	0.98830*	0.6548	0.06561	0.41427	0.75927	0.97487*	0.28994
		<0.0001	<0.0208	<0.8395	<0.1806	<0.0042	<0.0001	<0.3606
PAL		1	0.58065	-0.03514	0.32065	0.68349	0.98010*	0.19752
			<0.0477	<0.9137	<0.3095	<0.0143	<0.0001	<0.5383
AS			1	0.57016	0.84344^{ns}	0.91856*	0.64735	0.71282
				<0.0529	0.0006	<0.0001	<0.0229	<0.0093
CAT				1	0.60612	0.56516	0.07437	0.67457
					<0.0367	<0.0555	<0.8183	<0.0161
POX					1	0.88699*	0.43588	0.92038^{ns}
						<0.0001	0.1566	<0.0001
PPO						1	0.76512	0.78437
							<0.0037	<0.0025
SOD							1	0.33735
								<0.2836
INF								1
<i>S. chacoense</i>								
FEN	1	0.91767*	0.93716*	-0.71062	0.89009*	0.300085	0.92064*	0.40564
		<0.0001	<0.0001	0.0096	<0.0001	<0.3420	<0.0001	<0.1908
PAL		1	0.98966*	-0.67174	0.97759*	0.52415	-0.81567^{ns}	0.41652
			<0.0001	<0.0167	<0.0001	<0.0802	<0.0012	<0.1780
AS			1	-0.68758	0.95734	0.43068	-0.87955	0.45708
				<0.0135	<0.0001	<0.1622	<0.0002	<0.1352
CAT				1	-0.61174	-0.22404	0.63058	-0.43809
					<0.0345	<0.4839	<0.0279	<0.1543
POX					1	0.65802	-0.74233	0.31486
						<0.0200	<0.0057	<0.3188
PPO						1	-0.00745	-0.13046
							<0.9817	<0.6861
SOD							1	-0.44691
								<0.1452
INF								1

Continuación cuadro 17...

<i>S. demissum</i>								
ENZIMA	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	-0.01108	0.30248	0.25062	-0.0519	-0.03117	-0.53141	0.63976
		<0.9675	<0.2548	<0.3492	<0.8486	<0.9088	<0.0341	<0.0076
PAL		1	0.48317	0.42004	0.4008	0.1063	-0.0745	-0.1624
			<0.0580	<0.1053	<0.1239	<0.6952	<0.7839	<0.5479
AS			1	0.93839*	0.86661*	0.79347	-0.75724	0.69205
				<0.0001	<0.0001	<0.0002	<0.0007	<0.0030
CAT				1	0.93660*	0.82013*	-0.78851	0.7202
					<0.0001	<0.0001	<0.0003	<0.0017
POX					1	0.89051*	-0.70952	0.55593
						<0.0001	<0.0021	<0.0253
PPO						1	-0.69623	0.63283
							<0.0027	<0.0085
SOD							1	-0.84848*
								<0.0001
INF								1
<i>S. guerreorensis</i>								
FEN	1	-0.68348	0.18166	0.42292	0.84362*	0.36156	-0.36756	0.65865
		<0.0035	<0.5007	<0.1027	<0.0001	<0.1688	<0.1613	<0.005
PAL		1	0.49885	0.02424	-0.7171	-0.04433	0.58541	-0.37665
			<0.0492	<0.9290	<0.0018	<0.8705	<0.0172	<0.1504
AS			1	0.78761	0.15911	0.53962	0.63192	-0.00975
				<0.0003	<0.5561	<0.0310	<0.0086	<0.9714
CAT				1	0.58868	0.79467	0.62748	-0.15522
					<0.0164	<0.0002	<0.0093	<0.5660
POX					1	0.44004	-0.1691	0.38864
						<0.0881	<0.5313	<0.1368
PPO						1	0.44983	-0.32165
							<0.0804	<0.2244
SOD							1	-0.69566
								<0.0028
INF								1

Continuación cuadro 17...

<i>S. microdontum</i>								
ENZIMA	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	0.02051 <0.9399	0.45407 <0.0773	-0.10179 <0.7076	0.40129 <0.1234	0.80511^{ns} <0.002	-0.32478 <0.2197	0.53623 <0.0323
PAL		1	0.68784 <0.0032	0.91087* < 0.0001	0.76639 <0.0005	0.16347 <0.5452	0.63113 <0.0087	-0.64445 <0.0070
AS			1	0.6017 <0.0137	0.95487* < 0.0001	0.41774 <0.1074	0.23186 <0.3873	-0.03674 <0.8925
CAT				1	0.67262 <0.0043	-0.0155 <0.9546	0.52539 <0.0366	-0.60999 <0.0121
POX					1	0.45748 <0.0748	0.28037 <0.2929	-0.11851 <0.6620
PPO						1	-0.09662 <0.7219	0.17307 <0.5215
SOD							1	-0.723 <0.0016
INF								1
<i>S. pinnatisectum</i>								
FEN	1	-0.07828 <0.7732	-0.26861 <0.3145	-0.46387 <0.0703	0.22062 <0.4116	0.44526 <0.0838	0.87488 ^{ns} <0.0001	-0.56504 <0.0226
PAL			0.87886* <0.0001	0.56640 <0.0222	0.11120 <0.6818	-0.17282 <0.5221	-0.34471 <0.1910	0.00939 <0.9725
AS			1	0.82692* <0.0001	0.35065 <0.1830	0.26755 <0.3164	-0.55678 <0.0251	0.39778 <0.1270
CAT				1	0.51308 <0.0421	0.56710 <0.0220	-0.60187 <0.0136	0.69532 <0.0028
POX					1	0.64210 <0.0073	0.22027 <0.4123	0.43929 <0.0887
PPO						1	-0.40770 <0.1170	0.85652* <0.0001
SOD							1	-0.61033 <0.0120
INF								1

Continuación cuadro 17...

<i>S. stoloniferum</i>								
ENZIMA	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	0.50263	-0.23803	-0.07032	0.66099	-0.25029	-0.61452	0.5792
		<0.0472	<0.3747	<0.7958	<0.0053	<0.3498	<0.0113	<0.0187
PAL		1	0.43322	0.62085	0.41196	0.45717	-0.05938	0.76456
			<0.0937	<0.0103	<0.1128	<0.0750	<0.8271	<0.0006
AS			1	0.84671*	-0.293	0.44158	0.58142	0.10371
				<0.0001	<0.2708	<0.0868	<0.0182	<0.7023
CAT				1	-0.10987	0.46171	0.52712	0.40205
					<0.6854	<0.0718	<0.0359	<0.1227
POX					1	0.18053	-0.32785	0.6241
						<0.5034	<0.2151	<0.0098
PPO						1	0.35069	0.39177
							<0.1829	<0.1334
SOD							1	-0.23441
								<0.3822
INF								1
<i>S. Vernei</i>								
FEN	1	0.68101	-0.39083	-0.33649	-0.27262	-0.06363	0.52618	-0.65321
		<0.0148	<0.2091	<0.2849	<0.3913	<0.8443	<0.0789	<0.0213
PAL		1	0.32403	0.29761	0.40954	0.62263	0.7577	-0.03458
			<0.3043	<0.3475	<0.1861	<0.0306	<0.0043	<0.9150
AS			1	0.95617*	0.97848*	0.93887*	0.11185	0.90347*
				<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.7293	<0.0001
CAT				1	0.95106*	0.90726*	0.03634	0.86544
					<0.0001	<0.0001	<0.9107	<0.0003
POX					1	0.96266*	0.09054	0.82545^{ns}
						<0.0001	<0.7796	<0.0009
PPO						1	0.32701	0.72305
							<0.2995	<0.0079
SOD							1	-0.05053
								<0.8761
INF								1

Continuación cuadro 17...

VERRUCOSUM								
	FEN	PAL	AS	CAT	POX	PPO	SOD	INF
FEN	1	0.73773	0.46702	0.45317	0.19162	0.53447	-0.36076	0.67483
		<0.0011	<0.0682	<0.0779	<0.4771	<0.0329	<0.1698	<0.0041
PAL		1	0.69926	0.26193	-0.12767	-0.01846	-0.75683	0.70435
			<0.0026	<0.3271	<0.6375	<0.9459	<0.0007	<0.0023
AS			1	-0.2207	0.33287	-0.10949	-0.9073	0.90249
				<0.4114	<0.2077	<0.6865	<0.0001	<0.0001
CAT				1	-0.17566	0.45954	0.07757	-0.05992
					<0.5152	<0.0733	<0.7752	<0.8255
POX					1	0.56738	-0.01538	0.50831
						<0.0219	<0.9549	<0.0444
PPO						1	0.33172	0.24777
							<0.2094	<0.3549
SOD							1	-0.76417
								<0.0006
INF								1

*Nivel significativo con $p \leq 0.05$; ns= no significativo; INF= infección.