

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

DEFENSA QUÍMICA EN CLONES DE PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) CONTRA EL TIZÓN TARDÍO
(*Phytophthora infestans* Mont. De Bary).

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:



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

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

RIVERA HINOJOSA RODOLFO

Chapingo, México, mayo de 2004.

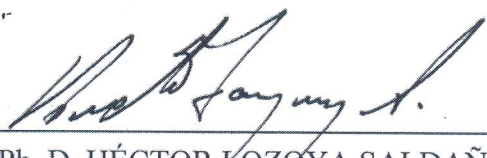


Instituto de Horticultura

**DEFENSA QUÍMICA EN CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CONTRA
EL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary).**

Tesis realizada por **RIVERA HINOJOSA RODOLFO**, bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



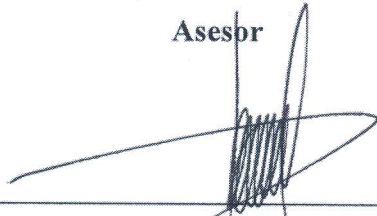
Ph. D. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

Director



Ph. D. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN

Asesor



M. C. DOMINGO MONTALVO HERNÁNDEZ

Asesor

Chapingo, México, mayo de 2004.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría (Gen: 2002-2003).

A la Universidad Autónoma Chapingo, muy especialmente al Departamento de Fitotecnia e Instituto de Horticultura.

Al PICTIPAPA en México por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al comité asesor por su asesoría en el desarrollo del presente trabajo. Por sus enseñanzas, aportaciones, dedicación y confianza.

Ph. D. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

Ph. D. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN

M. C. DOMINGO MONTALVO HERNÁNDEZ.

Al Ph. D. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA por su amistad y consejos.

Al personal del Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia.

Al Doctor Irán Alia y al Q. Agrícola Cecilio Bautista por su amistad y apoyo.

A mis compañeros y amigos de la Maestría, generación 2002-2003.

Pero sobre todo al que merece toda gloria, toda honra, todo honor y todo poder a Jesucristo nombre sobre todo nombre; por quién vivimos, nos movemos y somos.

DEDICATORIA

A mi Padre celestial, el Dios de los dioses que dio a su único hijo para que todo aquel que en Él (Jesús) cree, no se pierda más tenga vida eterna.

San Juan 3:16.

A mi familia: Mi madre (María Teresa Hinojosa G. -la Ley-) y mis hermanos.

A mi segunda familia: Fam. Espinoza Martínez. En especial a mi princesa (Luz Aurora E. M.).

A todos los lectores y buscadores de respuestas.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en el Municipio de Tuxpan, Michoacán (septiembre de 1977). En el mismo municipio realizó sus estudios de primaria en la Escuela Primaria Isaac Arriaga y egreso de la Escuela Secundaria Federal “General Francisco J. Mújica”. Sus estudios de preparatoria los llevó a cabo el Centro de Bachillerato Tecnológico Forestal No. 6 (CBTF No.6) en Ciudad Hidalgo, Mich.

En la Universidad Autónoma Chapingo estudió en el Departamento de Fitotecnia del cual egreso en el año 2001 obteniendo el titulo de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia.

Ha trabajado con productores en asesoría y capacitación técnica. En enero de 2002 ingreso a la Maestría en Ciencias en Horticultura en el Instituto de Horticultura en la Universidad Autónoma Chapingo.

DEFENSA QUÍMICA EN CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CONTRA EL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary).

Rodolfo Rivera-Hinojosa¹, Héctor Lozoya-Saldaña², María Teresa Colinas-León² y Domingo Montalvo-Hernández²

RESUMEN

A fin de identificar el tipo de resistencia genética en papa (*Solanum tuberosum* L.), se cuantificaron reacciones enzimáticas de defensa contra el ataque del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) en genotipos de papa con diversos niveles de resistencia al patógeno expuestos a la infección natural en el valle de Toluca, con y sin protección química. Hubo respuesta diferencial entre genotipos en función de su resistencia genética y de la presencia/ausencia de fungicidas. En el cultivar Alpha, susceptible, sin fungicidas, hubo correlación positiva infección/fenilalanina-amonioliasa (PAL) y fenoles/peroxidasa (POX) ($r=0.9860^*$ y $r=0.8998^*$, respectivamente), mientras que con protección química los fenoles se correlacionaron positivamente con ambas enzimas. En los clones resistentes hubo correlación positiva directa entre la infección y los fenoles, con y sin fungicidas, pero no se generalizó la relación inversa esperada de que a mayor cantidad de fenoles debió corresponder menor infección. También en los resistentes, incluido Zafiro, sin fungicidas, hubo correlación infección/POX, fenoles/POX y POX/PAL. Además, con fungicidas, los clones avanzados mostraron correlación positiva entre todas las variables con valores mayores a $r=0.7300$. Se concluye que la resistencia genética de los hospedantes no se le pudo atribuir a una sola de las variables o a alguna correlación específica, mas bien fue el resultado de la combinación de los factores estudiados.

Palabras clave: Papa, *Phytophthora infestans*, resistencia, PAL, POX, fenoles.

¹Posgrado en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México-Texcoco Km. 38.5. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. e-mail: rodoluz@hotmail.com

²Profesor-Investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

CHEMISTRY DEFENSE IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) CLONES AGAINST LATE BLIGHT (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary).

Rodolfo Rivera-Hinojosa¹, Héctor Lozoya-Saldaña², María Teresa Colinas-León² y Domingo Montalvo-Hernández²

ABSTRACT

In order to identify the type of genetic resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.), enzymatic reactions against late blight (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) were quantified in potato genotypes with different levels of genetic resistance to the pathogen exposed to natural infection in the Toluca Valley, Mexico, with and without chemical protection. There was a differential response among the genotypes on the basis of their genetic resistance and the presence/absence of fungicides. In the susceptible cultivar Alpha, without fungicides, an infection/phenylalanine-ammoniolase (PAL) ($r=0.9860^*$) and phenols/peroxidase (POX) ($r=0.8998^*$) correlation was observed, while with chemical protection phenols were correlated to both enzymes. A correlation between infection and phenols, with and without fungicides, was recorded in the resistant clones, but the expected inverse relationship that the more the phenols the less infection was not uniform. Also, the resistant genotypes, Zafiro included, with no fungicides, showed an infection/POX, phenols/POX, and POX/PAL correlation. In addition, with fungicides, the advanced clones had correlations among all the variables ($r>0.7300$). We conclude that the hosts genetic resistance, although incomplete, is multigenic, because it was not conferred by a single variable or by a specific correlation, but by a combination of the factors under study.

Key words: Potato, *Phytophthora infestans*, resistance, PAL, POX, phenols.

¹Posgrado in Horticulture. Autonomous University Chapingo. Carr. Mexico-Texcoco Km 38.5. Chapingo, State of Mexico. C. P. 56230, email: rodoluz@hotmail.com

²Professor Research of the Department of Fitotecnia of the Autonomous University Chapingo. Chapingo, State of Mexico.

CONTENIDO	Págs.
APROBACIÓN DE LA TESIS DE GRADO.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	2
1.1.1. Objetivo general.....	2
1.1.2. Objetivos específicos.....	2
1.2. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Resistencia de las plantas a enfermedades.....	3
2.1.1. Reacción de hipersensibilidad (RH).....	5
2.1.2. Resistencia sistémica adquirida (RSA).....	9
2.1.3. Transducción de señales en la RSA.....	11
2.1.4. Defensa debida a compuestos fenólicos.....	12

2.1.5. Defensa debida a fitoalexinas.....	16
2.1.6. Actividad de PAL y POX en la resistencia a enfermedades.....	20
2.1.6.1. Fenilalanina amonio-liasa.....	20
2.1.6.2. Peroxidasa (POX).....	23
2.2. El tizón tardío de la papa.....	25
2.3. Control genético.....	25
2.3.1. Resistencia vertical.	26
2.3.2. Resistencia horizontal.	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. Localización del experimento.....	28
3.2. Material vegetal.	28
3.3. Diseño experimental y tratamientos.....	28
3.4. Desarrollo del experimento y variables evaluadas.....	29
3.5. Trabajo de laboratorio.....	30
3.5.1. Determinación de fenoles.....	30
3.5.2. POX.....	30
3.5.3. PAL.....	31
3.6. Análisis de resultados.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Porcentaje de infección.....	33
4.2. Fenoles totales.....	35
4.3. Actividad de POX.....	39
4.4. Actividad de PAL.....	42

4.5. Análisis de correlación.....	45
5. CONCLUSIONES.....	49
6. LITERATURA CITADA.....	50
7. APÉNDICE.....	63

INDICE DE CUADROS	Págs.
Cuadro 1. Correlación entre variables para Alpha.....	46
Cuadro 2. Correlación entre variables para Zafiro.....	47
Cuadro 3. Correlación entre variables para A00531-21.....	48
Cuadro 4. Correlación entre variables para A00502-3.....	48
Cuadro 5. Correlación entre variables para A00499-5.....	48

INDICE DE FIGURAS

Págs.

Figura 1.- Esquema de las reacciones de defensa de una planta infectada por un hongo fitopatógeno con penetración directa.....	4
Figura 2.- Modelo conceptual de la ruta que conduce al establecimiento de la RSA.....	10
Figura 3.- Biosíntesis de fitoalexinas derivadas de isoflavona y sesquiterpeno (risitina).....	17
Figura 4.- Ruta biosintética de fenilpropanides.....	21
Figura 5.- Porcentaje de infección en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida.....	34
Figura 6.- Concentración de fenoles totales en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida.....	36
Figura 7.- Actividad de POX en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida.....	40
Figura 8.- Actividad de PAL en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida.....	43

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos ya sea mediante características estructurales como barreras físicas que impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. Cada vez se hace más evidente que la resistencia de una planta al ataque de un patógeno no solo estriba en las barreras estructurales sino en las sustancias que producen sus células antes o después de haberse producido la infección (Agrios, 2001). A nivel bioquímico se conoce poco sobre el mecanismo de resistencia, pero se cree que tiene que ver con el fenómeno de reconocimiento durante la primera etapa del proceso de patogénesis (Colon y Budding, 1988; Corné *et al.*, 1992). Con frecuencia se ha observado que ciertos compuestos fenólicos “comunes” que son tóxicos para los patógenos, se producen y acumulan a un ritmo mucho mayor después de haberse producido la infección en una variedad resistente que en una susceptible (Agrios, 2001). Las fitoalexinas son sustancias tóxicas que las plantas producen en cantidades apreciables sólo después de haber sido estimuladas por los diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos o haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos. La mayoría de esas fitoalexinas se producen en las plantas en respuesta principalmente a la infección causada por hongos, en general son mucho más tóxicas para hongos que para bacterias, aunque puede haber excepciones (Salisbury y Ross, 1994). La resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno, estos resultados se han observado en tubérculos de papa (Goodman *et al.*, 1986). Los patógenos que atacan a las plantas

inducen alteraciones metabólicas, así como la síntesis de enzimas por parte de la planta, que dan lugar al desarrollo de resistencia en torno a los sitios de infección. Una enzima que por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor, en los tejidos enfermos es la fenilalanina-amonio-liasa (PAL) que es una enzima clave en la producción de la molécula básica precursora en la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Agrios, 2001). Existen estudios que relacionan cuantitativamente la síntesis de estas sustancias con el nivel de resistencia genética de la papa al ataque de aislamientos específicos de tizón tardío (Andreu *et al.*, 2000). En el presente estudio se demuestra una respuesta similar bajo condiciones de infección natural de una mezcla de variantes del patógeno.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Estudiar las respuestas de defensa en clones de papa con diversos grados de resistencia genética al tizón tardío (*Phytophthora infestans*).

1.1.2 Objetivos específicos

Cuantificar los cambios de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), peroxidasa (POX) y concentración de fenoles totales en los genotipos incluidos en este estudio.

Correlacionar dichos cambios con los porcentajes de infección y la influencia de protección química.

1.2. Hipótesis

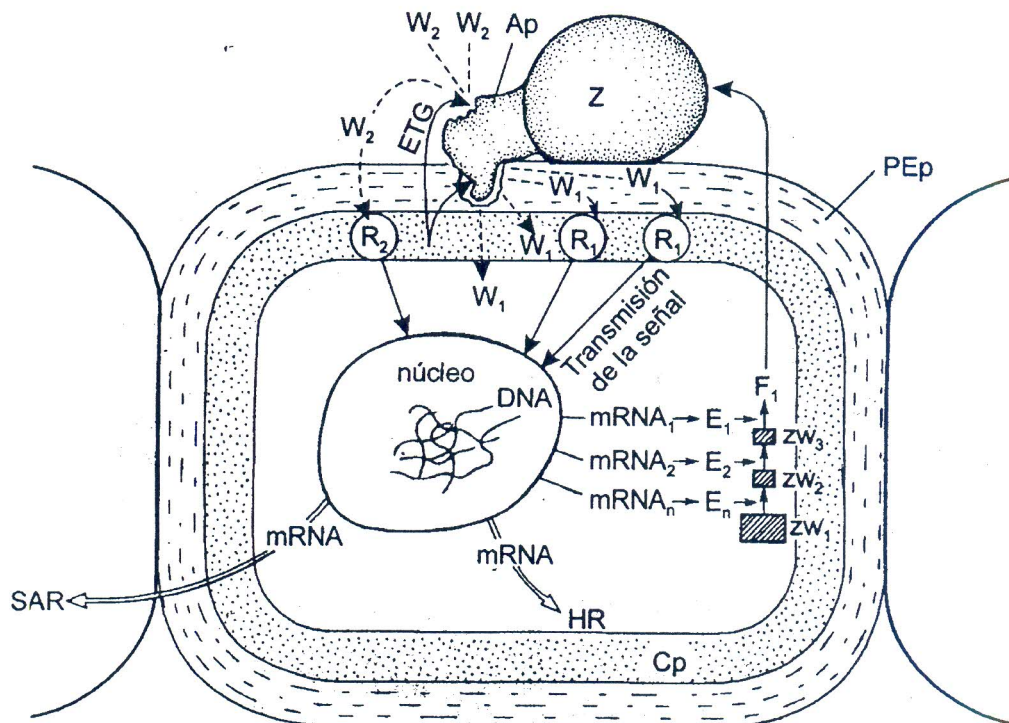
La actividad de la fenilalanina-amonio-liasas (PAL), peroxidasa (POX) y la concentración de fenoles totales es mas alta en los clones que presentan un mayor grado de resistencia en comparación con los susceptibles.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Resistencia de las plantas a enfermedades

La resistencia de la planta a enfermedades por patógenos tales como hongos, bacterias, y virus depende a menudo de si ésta puede reconocer al patógeno al inicio del proceso de infección. La resistencia a enfermedades a menudo se manifiesta por una restricción en la multiplicación y movimiento del patógeno (hongo, bacteria y/o virus), en un área pequeña alrededor del punto de infección, en donde aparece una lesión necrótica como respuesta de la planta a la infección; este fenómeno recibe el nombre de reacción de hipersensibilidad (HR) (Ryals *et al.*, 1994). Esta reacción es capaz de inducir la resistencia sistémica adquirida (RSA), la cual puede ser local si se presenta en lugares adyacentes a las lesiones necróticas y sistémica cuando se detecta en partes del hospedero que no han sido atacadas por patógenos (Raskin, 1992). Por otra parte, cuando una planta es infectada por un patógeno al que es susceptible, el patógeno se multiplica y frecuentemente se disemina a toda la planta, donde puede causar daño considerable o la muerte del hospedero. La susceptibilidad puede ser causada por la incapacidad de la planta para reconocer o responder de manera efectiva contra la infección (Klessig y Malamy, 1994). No se sabe con certeza si cualquier planta es resistente o no a las enfermedades sólo porque en sus células existe un compuesto

inhibidor antes de que se produzca la infección (Agrios, 2001). En la figura 1, se pueden observar de manera general las reacciones de defensa de una planta infectada por un hongo patógeno.



Fuente: Jankiewicz y Sobiczewski, 2003.

Figura 1. Esquema de las reacciones de defensa de una planta infectada por un hongo fitopatógeno con penetración directa. Una espora del hongo (Z), después de unirse a la pared de la célula de epidermis (PEp), genera un apresorio (Ap) y empieza a formar el micelio que penetra a la pared celular del hospedante. El micelio segrega enzimas que destruyen esta pared. Los fragmentos de la pared destruida son los elicitores de la reacción de defensa (W_1). Sin embargo, la célula del hospedero tiene también sus propias enzimas de defensa la que digieren la pared celular del hongo (ETG). Los fragmentos desprendidos de ella sirven también como elicitores (W_2). Asimismo las secreciones del hongo pueden servir como elicitores. Los elicitores se unen a los receptores correspondientes (R_1 , R_2) y empiezan la transducción de la señal al núcleo, informándole que ocurre una infección. Al recibir esta señal, se presenta en el núcleo la expresión de toda la gama de genes de defensa, entre otros, genes responsables de la producción de fitoalexinas. Estos genes generan los mRNAs para las enzimas (E_1 , E_2 , E_n) necesarias para la síntesis de los precursores ZW_1 , ZW_2 , ZW_3 de la fitoalexina (F_1). Además, puede ocurrir la expresión de los genes responsables de los fenómenos llevando a la muerte rápida de la célula (reacción de hipersensibilidad = RH) o de la resistencia sistémica adquirida (RSA) y otras reacciones de defensa. Cp – plasmalema y las capas exteriores del citoplasma.

2.1.1. Reacción de hipersensibilidad (RH)

El reconocimiento del patógeno por la planta conduce a una necrosis rápida del tejido fino en el sitio de la infección la cual es llamada reacción de hipersensibilidad (RH). La RH priva al patógeno de alimentos y/o lanza las moléculas tóxicas, de tal modo que el crecimiento del patógeno es confinando a una región pequeña de la planta. Esta respuesta proporciona resistencia para la gran mayoría de patógenos potenciales. En ciertas especies de plantas, existe una cobertura mucho más limitada, ya que algunos patógenos tienen la capacidad de evadir el sistema del reconocimiento del hospedante y crecen extensivamente dentro de la planta. En este caso, la susceptibilidad de la planta es expuesta y el crecimiento extenso del patógeno pueden causar varios grados de daño. Sin embargo, ciertas razas dentro de las especies patógenas como bacterias o fúngicas son reconocidas por ciertos cultivares o genotipos del hospedero y se acciona la RH. El reconocimiento de patógeno acciona una gama grande de mecanismos de defensa, que se cree pueden contribuir a la resistencia total en la planta (Mona, 1994). Los mecanismos inducidos en el sitio de la infección y asociados con la RH incluyen la síntesis de los compuestos antimicrobianos entre los que están la mayoría de los compuestos fenólicos tales como los ácidos clorogénico y caféico, o los productos de la oxidación de los compuestos fenólicos y las fitoalexinas, que en su mayoría también son compuestos fenólicos (Beckman, 2000; Abbasi *et al.*, 2001; Agrios, 2001). Algunos de los agentes químicos producidos de esa forma se hallan en concentraciones lo bastante altas para contrarrestar los daños por hongos y bacterias, y alteraciones en la síntesis de las proteínas estructurales de la membrana celular. Muchas de estas respuestas son debido a la activación transcripcional de los genes específicos que se conocen colectivamente

como defensa de la planta o genes relacionados con la defensa. Sin embargo, algunos de los compuestos que liberan ciertos tipos de plantas, al parecer tienen una función inhibitoria ante el ataque de ciertos patógenos (Mona, 1994). La conexión entre la reacción de hipersensibilidad y la acumulación de fitoalexinas ha sido demostrada en plantas de *Brassica napus* (Rouxel *et al.*, 1989). Keen (1981). Supone que la acumulación de fitoalexinas también se presenta en las células muertas. Por eso se convierten en un depósito de sustancias antibióticas y una barrera química adicional que limita el desarrollo del patógeno. En la mayoría de los casos, la muerte de las células que rodean el lugar infectado es un obstáculo suficiente para la propagación del patógeno, si este no es hábil para desarrollarse sobre un tejido necrótico. Una vez establecido el patógeno en la planta se requieren de varios mecanismos de patogenicidad; por ejemplo enzimas capaces de degradar las paredes celulares de la planta o toxinas con las cuales inhibe reacciones en la célula. Las toxinas pueden funcionar como algunas moléculas que inhiben las reacciones de defensa de la planta y puede hacer que la interacción incompatible se convierta en una interacción compatible (Yoder, 1980).

La pudrición blanda de la papa causada por *Erwinia carotovora*, inmediatamente después de invadir el tejido de la planta, produce una enorme cantidad de enzimas que degradan la pared celular del hospedero generando los síntomas típicos de la pudrición. El factor de mayor virulencia de esta bacteria son las pectato liasas (Wegener, 2002).

En algunos cultivares de la soya, la herida o la muerte de una célula presenta una reacción de hipersensibilidad (RH), la cual se requiere para la activación inmediata de células próximas que rodean para desplegar respuestas de la defensa al elicitor ó inductor glucano de la pared celular contra el patógeno *Phytophthora sojae*.

Estas respuestas próximas de la defensa incluyen la deposición de polímeros fenólicos y la acumulación de fitoalexinas gliceolinas (Abbasi *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que en el mecanismo de RH las formas activas del oxígeno desempeñan un papel importante. Cuando la reacción de hipersensibilidad ya está iniciada las formas activas de oxígeno (AO) alrededor del sitio de infección aumentan rápidamente. Este fenómeno es llamado explosión oxidativa y ocurre en muchas especies de plantas llamadas AOS (Active Oxygen Species). Esta respuesta a los patógenos o elicitores se ha observado en diversas monocotiledóneas y dicotiledóneas incluyendo el arroz, el tabaco, la soja, y *Picea abies* (Mona, 1994).

Las formas activas del oxígeno son intermediarios tóxicos que resultan de pasos sucesivos de un electrón en la reducción molecular del O_2 . Las formas activas predominantes en interacciones planta-patógeno son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($OH^\cdot$). La explosión oxidativa se correlaciona con la RH en los trabajos de interacciones planta-patógeno y por lo tanto puede ser un elemento importante que contribuye a la resistencia de la enfermedad (Mona, 1994).

La primera reacción durante la explosión oxidativa inducida por el patógeno es posiblemente la reducción de un electrón de oxígeno molecular para formar el anión de superóxido (O_2^-). En soluciones acuosas, el anión del superóxido experimenta la reducción espontánea en una reacción total escrita como $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Esta reacción ocurre en un rango más alto en el pH ácido, por ejemplo se encuentra en la pared de célula (Sutherland, 1991) y es catalizada por la enzima superóxido dismutasa que ocurren en el citosol, cloroplastos, y mitocondrias (Scandalios, 1993).

El ion O_2^- también puede actuar como agente para la reducción de metales de transición tales como Fe^{3+} y Cu^{2+} . Una consecuencia importante de la reducción de metales es que puede conducir a H_2O_2 , formación dependiente de radicales hidroxilo (Mona, 1994). También se ha demostrado que los inductores fungicidas no específicos pueden accionar la explosión oxidativa (Doke, 1983a). En soya, de la pared celular de la planta se derivó el ácido poligalacturónico y de la pared celular del hongo glicoproteínas, se sabe que esto estimula la explosión oxidativa, y sus receptores fueron encontrados en la membrana plasmática (Apostol *et al.*, 1989).

La evidencia actual es limitada pero varios estudios indican que la explosión oxidativa reduce directamente la viabilidad del patógeno. La germinación de esporas para un número de hongos patógenos, se ha demostrado que es inhibida por concentraciones micromolares del H_2O_2 (Peng y Kuc, 1992). Además, niveles más bajos de enzimas antioxidantes en diversos cultivares de la haba fueron correlacionados con mayor resistencia a la infección el patógeno (Buonaurio *et al.*, 1987).

La explosión oxidativa parece desempeñar un papel original en la consolidación de la pared celular de la planta atacada por el patógeno. La posibilidad de que la explosión oxidativa funcione como intermediario de señales que inducen biosíntesis de fitoalexinas ha recibido considerable atención (Mona, 1994).

Los peróxidos lípidos generados por la reacción no enzimática de la explosión oxidativa pueden servir como precursores en la síntesis del ácido jasmónico, un regulador conocido de varios genes de defensa expresados durante la RH (Farmer y Ryan, 1992).

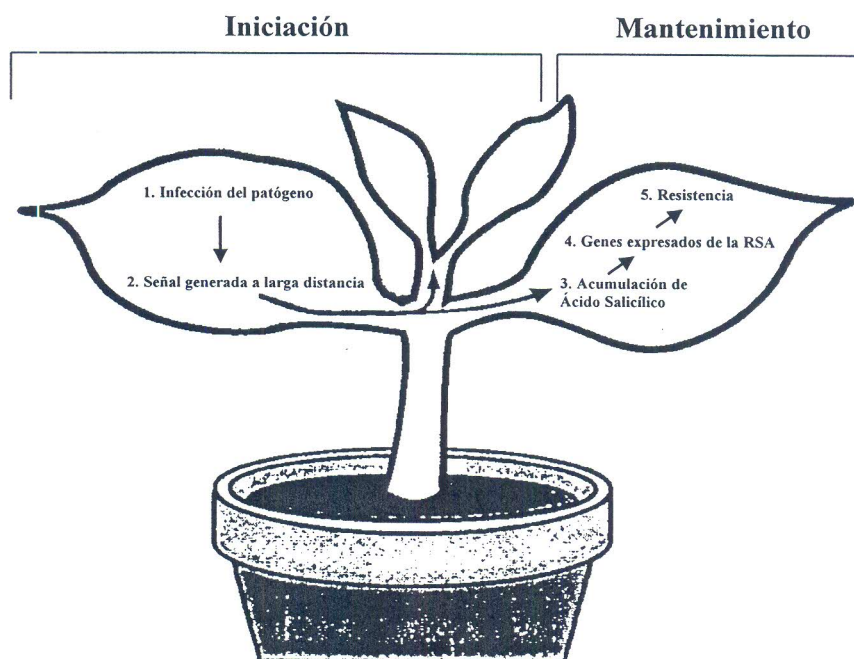
La alta acumulación localizada de H_2O_2 tiene un papel directo como agente antimicrobiano (Bestwick *et al.*, 1997). El H_2O_2 de la explosión oxidativa desempeña un papel dominante en la ordenación de una respuesta hipersensible de la planta durante la expresión de resistencia a enfermedades (Levine *et al.*, 1994).

2.1.2. Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)

Una reacción de plantas a la infección del patógeno es la inducción de un duradero y amplio-espectro de resistencia sistémica a infecciones subsecuentes. Esta inducción de resistencia a la enfermedad ha sido conocida por muchos años bajo diversos nombres tales como inmunidad fisiológica adquirida o resistencia sistémica inducida; actualmente se le conoce como Resistencia Sistémica Adquirida. La perspectiva es que la RSA es un componente integrado por un gran repertorio de resistencia a enfermedades de plantas (Ryals *et al.*, 1994).

En los últimos 30 años, la RSA se ha demostrado en muchas especies de plantas y el espectro de resistencia se ha ensanchado para incluir no solamente virus y bacterias, sino también muchos hongos fitopatógenos de importancia agronómica (Kuc, 1982).

Ryals *et al.*, (1994) proponen un modelo de trabajo actual de la resistencia (figura 2). Este modelo no es del todo completo pero sirve como base en el cual se pueden construir y probar hipótesis. De acuerdo a este modelo la RSA se puede dividir dos fases, iniciación y mantenimiento. La fase de la iniciación puede ser transitoria e incluye a todos los acontecimientos que conducen al establecimiento de la resistencia.



Fuente: Ryals *et al.*, 1994.

Figura 2.- Modelo conceptual de la ruta que conduce al establecimiento de la RSA.

El primer paso en el desarrollo del RSA es el reconocimiento de la infección del patógeno por la planta. Una vez que la planta reaccione al patógeno, se mandan las señales que accionan resistencia en lugares adyacentes así como tejidos distantes. Algo importante, no todas las interacciones planta-patógeno conducen a la inducción de RSA. Las interacciones compatibles pueden conducir a la inducción del RSA; así, el patógeno necesita inducir una reacción de resistencia gen por gen (Kuc, 1982).

El período del mantenimiento describe la resistencia del constante estado de los resultados de la iniciación. Estos términos sirven simplemente como definiciones operacionales y no significa que los procesos sean distintos (Ryals *et al.*, 1994).

Claramente se puede decir que la RSA es un componente importante de resistencia a enfermedades que contribuye significativamente en la salud de la planta. Entender las bases bioquímicas y moleculares de la RSA puede conducir al desarrollo de fungicidas que actúen estimulando mecanismos naturales de resistencia a la enfermedad y variedades mejoradas de cultivos (Ryals *et al.*, 1994).

En un trabajo realizado en tomate, la resistencia sistémica fue inducida infectando las hojas más bajas con *Phytophthora infestans*. El nivel de resistencia aumentó durante 7 días después de la inducción y permaneció en ese nivel por lo menos 7 días más. Los cambios en proteínas solubles ácidas y actividad de la quitinasa fueron inducidos y aumentados en forma paralela a la resistencia sistémica (Enkerli *et al.*, 1993).

2.1.3. Transducción de señales en la RSA

De forma temprana en la interacción entre el hospedero y el patógeno, se producen señales que inducen respuestas en los lugares respectivos. Este proceso implica la interacción entre las moléculas patógeno-asociadas (elicitors) y los receptores de la planta. Este reconocimiento resulta por una cascada de transducción de señales resultado de la activación de genes de defensa y la expresión de la resistencia a la enfermedad por parte del hospedero. El reconocimiento específico entre el hospedero y el patógeno determina el resultado de la interacción (Keen, 1990). La resistencia o la susceptibilidad de las plantas a diversas razas de un patógeno es determinada por la cantidad de genes de resistencia dominantes (De Wit, 1992). El éxito de la resistencia de hospedero contra la invasión del patógeno requiere el reconocimiento, la expedición y activación de el repertorio de defensa necesario. Una respuesta alta en las plantas implica el

reconocimiento de genes dependientes involucrados en la resistencia (genes R) de elicitores derivados de patógenos y la iniciación localizada en la necrosis en la célula en el sitio de la infección del patógeno (Devadas y Raina, 2002).

Indudablemente la característica más sensible de esta respuesta de resistencia gene dependiente (R) es la rápida muerte celular y puede ser definida dentro del sitio de infección como un proceso de respuesta hipersensitiva (RH). La muerte celular es precedida por cambios en los flujos de iones, explosión oxidativa y la reticulación de proteínas de pared celular. Los procesos de muerte celular son acompañados por un incremento en la biosíntesis del ácido salicílico (AS), la activación transcripcional de varios genes patogénicos (GP) de transcripción relacionados y el establecimiento de una respuesta sistémica duradera conocida como resistencia sistémica adquirida (RSA) (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

La ruta de las señales para que se de la RSA, resistencia genética y susceptibilidad a enfermedades son afectadas por la acumulación de AS. Las plantas que no pueden acumularlo están expuestas a la infección y establecimiento del patógeno. Entonces la dependencia del AS en la transducción de señales juega un papel central en la defensa de plantas contra patógenos (Ryals, *et al.*, 1995). Chen *et al.* (1993) indican que el ácido salicílico puede ser el inductor de los genes específicos de la defensa de la planta durante el desarrollo de la RSA.

2.1.4. Defensa debida a compuestos fenólicos

El término fenoles o polifenoles es usado para definir sustancias que poseen uno o más sustituyentes hidroxilo (OH⁻) unidos a un anillo aromático (Waterman y Mole, 1994; Strack, 1997; Angenault, 1998), incluyendo derivados funcionales como ésteres, ésteres

de metilo, glucósidos, etc. (Harborne, 1989). Robards *et al.*, (1999), proponen que los fenoles son aquellas sustancias derivadas a partir del metabolismo fenilpropanoide y la ruta de ácido shiquímico. Sin embargo este autor no considera que algunos fenoles se puedan sintetizar de la ruta del acetato/malonato (Harborne, 1989; Piñol *et al.*, 2000) y del acetato/mevalonato (Waterman y Mole, 1994; Strack, 1997). De los 100 000 compuestos conocidos del metabolismo secundario gran parte pertenecen a los fenoles (Waterman y Mole, 1994). Estos autores también mencionan que la gran mayoría de las moléculas de los fenoles debe su origen a uno o más de los tres compuestos siguientes: eritrosa 4-fosfato, fosfoenolpiruvato, y acetil CoA. De estos eritrosa 4-fosfato y fosfoenol piruvato, son responsables de lo que es conocido como la ruta del ácido shiquímico, mientras que acetil CoA y su forma activada, malonil CoA, son centrales en la ruta del policétido o acetato. Acetil CoA se puede transformar a ácido mevalónico el cual es el inicio para los fenoles y la gran cantidad de terpenoides, lo anterior es similar a lo expresado por Strack (1997).

En la mayoría de las revisiones se presenta solamente la ruta del ácido shiquímico y biosíntesis de fenilpropanoides como lo más importante, debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos de interés que se originan, y la ruta del policétido y mevalonato se describen poco (Harborne, 1989; Salisbury y Ross, 1994; Robards *et al.*, 1999; Parr y Bowell, 2000; Piñol *et al.*, 2000).

Con frecuencia se ha observado que ciertos compuestos fenólicos que son tóxicos para los patógenos, se producen y acumulan a un ritmo mayor en una variedad resistente que en una susceptible después de haberse producido una infección. Algunos ejemplos de esos compuestos son el ácido clorogénico, el ácido cafeico y escopoletina (Agrios, 2001). Strack (1997) menciona que los fenoles son de gran importancia como material

de soporte y forman parte de la pared celular (ligninas, suberinas), algunos se pueden acumular como fitoalexinas como resultado del ataque de microorganismos contribuyendo a la resistencia de enfermedades. Algunas plantas exudan de la raíz fenoles que actúan como toxina (el cinamato en *Parthenium argentatum*). Muchos fenoles y la oxidación de sus productos como las quinonas son altamente tóxicos al hongo invasor (Vidhyasekaran, 1988). En la actualidad se puede establecer que los fenoles juegan un papel importante en la determinación de la resistencia o susceptibilidad de un hospedero a la infección de un parásito (Velazhahan y Vidhyasekaran, 1994). La acumulación de compuestos fenólicos durante la infección por patógenos ha sido reportada como alta en plantas resistentes y baja en plantas susceptibles (Arora y Wagle, 1985; Patil *et al.*, 1985; Bashan, 1986 Velazhahan y Vidhyasekaran, 1994).

Velazhahan y Vidhyasekaran (1994) al trabajar con variedades susceptibles y resistentes de *Arachis hypogaea* L. a *Puccinia arachidis* Speg. y Luthra *et al.* (1988) al trabajar con sorgo infectado con *Ramulispora sorghicola* Harris, encontraron que la inoculación con el patógeno resultó en mayor concentración de fenoles en plantas resistentes que en las susceptibles.

De acuerdo con Lulai y Corsini (1998), la suberización rápida de los tubérculos heridos de la papa es crítico para evitar la infección por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Fusarium sambucinum*. También encontraron que los fenoles de suberinas juegan un papel importante en la deposición de suberina dentro de la primera capa de la célula, proporcionándole cierto grado de resistencia.

En trigo susceptible (WL 711) a *Neovossia indica*, los fenoles totales alcanzaron un máximo 2 días después de la inoculación (d.d.i). En genotipos resistentes HD 29 (*Triticum aestivum*) y DWL 5023 (*T. durum*), los fenoles totales no cambiaron perceptiblemente para 6 d.d.i., pero declinaron perceptiblemente en 10 d.d.i. Tres compuestos; fenoles, ácido caféico, L-1-tiosinae hidroquinona, fueron detectados al usar de la cromatografía de capa delgada. Los primeros dos fueron detectados siempre en los tres materiales de trigo después de la inoculación, pero la hidroquinona fue detectada solamente en los trigos resistentes en 6 d.d.i. (Gogoi *et al.*, 2001).

Hay células especializadas de plantas que sintetizan fenoles y los almacenan en sus vacuolas durante los procesos normales de la diferenciación. Tales fenoles se distribuyen dentro de la mayoría de los tejidos finos. En algunos de estos tejidos ocurren uniformemente en todas las células, mientras que en otros ocurren de forma dispersa o aleatoriamente, y en otros inmóviles aparecen establecidos estratégicamente en los puntos potenciales de la entrada. Debido a la descompartamentación de estas células, primeramente pueden provocar una rápida oxidación de su contenido fenólico, lignificación y suberización de células, y muerte celular. Aislando infecciones o lesiones en el sitio inmediato de la penetración celular. En segundo lugar, si esta defensa falla y persiste la tensión, estos mismos procesos promueven la acumulación prolongada de ácido indolacético (IAA) y de etileno que promuevan otra cascada de reacciones en células periféricas que incluya respuestas secundarias del metabolismo como resultado de una defensa mayor (Beckman, 2000).

2.1.5. Defensa debida a fitoalexinas

Las fitoalexinas son sustancias tóxicas que las plantas producen en cantidades apreciables sólo después de haber sido estimuladas por los diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos, o bien después de haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos. Las fitoalexinas se producen por las células sanas adyacentes a las células necróticas y dañadas, en respuesta a sustancias que se difunden a partir de las células dañadas. La resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno, la mayoría de las fitoalexinas conocidas son tóxicas a los hongos fitopatógenos cuyo desarrollo inhiben, pero algunas también son tóxicas a bacterias, nemátodos y otros organismos patógenos (Goodman *et al.*, 1986; Andreu *et al.*, 2000).

Algunas de las fitoalexinas mejor estudiadas incluyen a la faseolina y cievitona en el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la pisatina en el chícharo (*Pisum sativum*), la hidroxifaseolina en la soya (*Glycine max*), en alfalfa (*Medicago sativa*) la medicarpina y el cumesterol, en cebolla (*Allium cepa*) las llamadas cibulinas, la rishitina en la papa (*Solanum tuberosum*), el gosipol en el algodón (*Gossypium herbaceum*), en zanahoria (*Daucus carota*) es la 6-metoximeleina y el capsidiol en el chile (*Capsicum annuum*) (Agrios, 2001; Jankiewicz y Sobiczewski, 2003). En la figura 3, se puede observar la ruta de la biosíntesis de algunas fitoalexinas.

Hasta hoy se conoce poco de cómo el ataque de patógenos o daños físicos generan la producción de fitoalexinas. Hahn *et al.*, (1981) encontró que los fragmentos de polisacáridos pectínicos de las paredes celulares de la planta pueden servir como inductores (elicitores) de la producción de fitoalexinas. Este fenómeno puede ser interesante ya que las enzimas del hongo al destruir las paredes celulares del hospedante

producen muchos fragmentos de este tipo. Por otro lado, parece ser probable que los factores físicos como congelamiento, causan la producción de fitoalexinas estimulando primeramente la producción de las enzimas que separan fragmentos de las paredes celulares de la planta sirviendo en seguida como elicitores (Lyon y Albersheim, 1982).

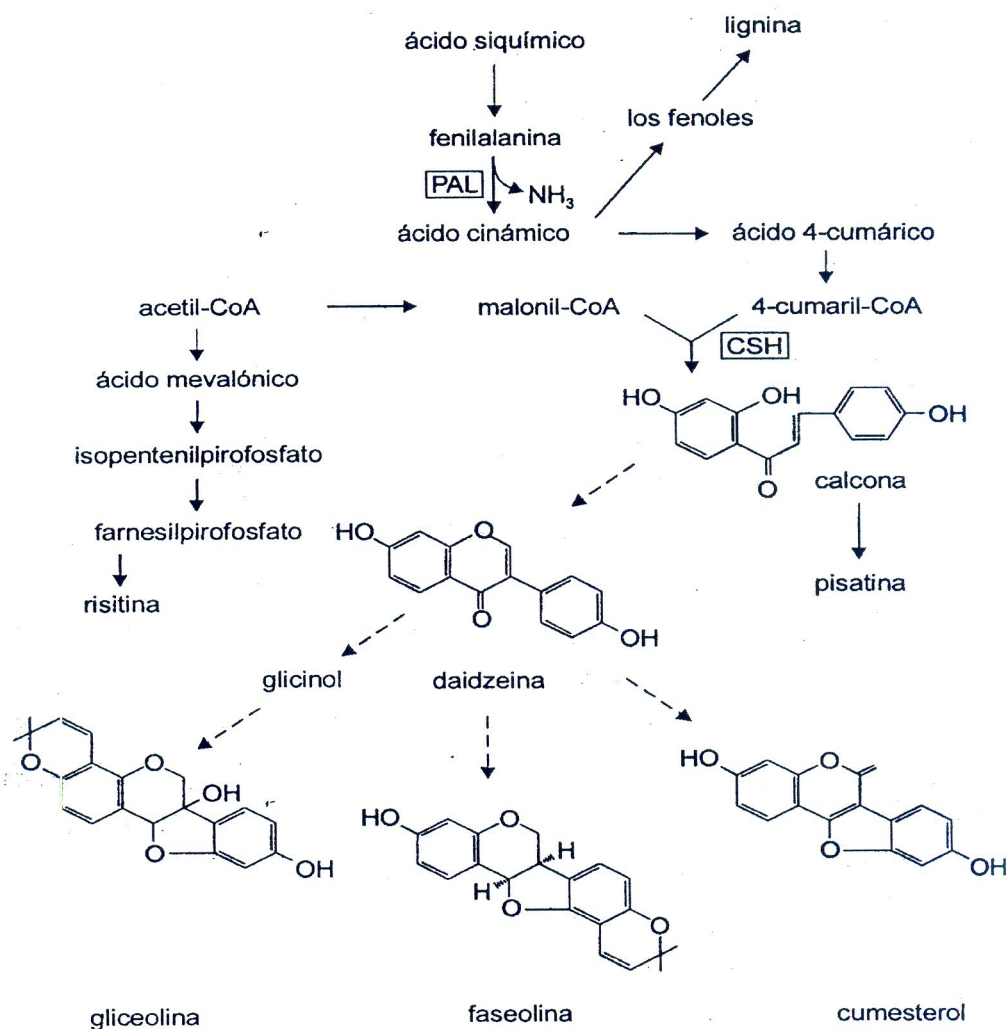


Figura 3.- Biosíntesis de fitoalexinas derivadas de isoflavona y sesquiterpeno (risitina) según Ward 1986 y Szakiel 1991; citados por Jankiewicz y Sobiczewski (2003). PAL: fenilalanina-amonio-liasas; CSH: sintasa de chalcona.

Mucharromah *et al.*, (1995) al inocular rodajas de tubérculos de papa con razas incompatibles de *Phytophthora infestans* encontraron una acumulación de fitoalexinas. En vid las fitoalexinas, sustancias fenólicas derivadas del grupo estilbeno, se han reconocido como compuestos antimicrobianos que defienden la planta, junto al resveratrol y viniferina, del ataque de algunos hongos como: *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Uncinola necator* como también de las radiaciones UV (Hegnauer, 1990; citados por Jankiewicz y Sobiczewski, 2003).

Se han aislado dos inductores de tipo ácido graso, de *Phytophthora infestans*, patógeno de la papa (*Solanum tuberosum* L.): ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico, relacionados a las hormonas animales prostaglandinas (Bostock *et al.*, 1981). Según Darvill y Albersheim (1984), los inductores actúan a nivel de transcripción liberando la expresión de genes que codifican las enzimas necesarias para la producción de fitoalexinas, ya que son tóxicas para ellos mismos. Los elicitores de fitoalexinas se producen más frecuentemente como consecuencia de la infección causada por hongos, aunque también se han descrito elicitores producidos durante la infección por bacterias (*Pseudomonas corrugata*), las cuales inducían la producción de medicarpina en trébol blanco (*Trifolium repens*) (Gustine *et al.*, 1991).

El etileno aumenta bruscamente durante el estrés y cuando este estrés es causado por la infección de un patógeno, el etileno puede iniciar la producción de fitoalexinas, que es lo que sucede en zanahoria (Boller, 1982).

El nivel de ácido jasmónico (AJ) o su ester metílico (AJ-Me), también aumenta rápidamente en plantas heridas o dañadas por los patógenos y existe la suposición de que debido a este fenómeno se incrementa la segregación de etileno en los tejidos, ya que se conoce que los jasmónidos influyen en la producción de etileno y viceversa. Al tratar los

tejidos con el éster metílico del ácido jasmónico aumenta la expresión de los genes que codifican la fenilalanina-amonio-liasa y la cintaza de calcona, las cuales están involucradas en la formación de fitoalexinas (Saniewski, 1995). Cvikrová *et al.*, (2003) aplicó etefon a alfalfa y aumentó la concentración del etileno exógeno en las células embriogénicas e indujo cambios en el metabolismo de sustancias fenólicas y en actividad de la peroxidasa. También hubo un incremento en la actividad de la PAL sobre el nivel básico y fue acompañada por una acumulación elevada de los ácidos fenólicos. Hubo la incorporación de la mayoría de ácidos fenólicos nuevamente sintetizados en las fracciones de glucósidos y ésteres para la zona de la pared celular. La actividad creciente de peroxidasa limitada a pared celular después de la aplicación del etefon se correlacionó con la incorporación pronunciada del ácido ferúlico en las paredes celulares. En contraste, el nivel creciente del etileno exógeno no influenció el crecimiento del cultivo de embriones más avanzados ni alteró significativamente el metabolismo del fenilpropanoide.

También se sabe que los pesticidas aplicados contra algunos patógenos también pueden inducir la producción de fitoalexinas. Cahill y Ward (1989) reportan que el metalaxyl usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* en soya liberaba de su micelio los elicitores de la gliceolina aumentando la síntesis de esta fitoalexina. Por su parte Dercks y Creasy (1989) correlacionaron la acción curativa de Fosetyl-Al con el nivel de acumulación de la fitoalexina resveratrol en la vid. Trujillo *et al.*, (2001) determinaron el efecto del activador de resistencia Bion 50 WG como estrategia de control químico del tizón tardío para cultivares resistentes, y el control de manchas foliares fungosas y rizoctoniasis obteniendo resultados positivos.

Las funciones de las fitoalexinas y fitoalexinas terpénicas en la resistencia parece bastante prometedora. Sin embargo, en síntesis acelerada inhibe el crecimiento de la hifa del hongo, pero no los niveles de esporulación del mismo; además, los niveles de fitoalexinas en interacciones compatibles son muy bajos y por tanto incapaces de afectar el desarrollo del hongo, cosa que no ocurre en interacciones incompatibles. Por tanto, este tipo de resistencia podría ser interpretada como vertical, ya que aparentemente responde a interacciones del tipo gen por gen, aunque a la fecha se conocen tres factores genéticos que regulan la expresión de las proteínas responsables de la síntesis de estos compuestos y su carácter cuantitativo. Además, las plantas contienen comúnmente no una fitoalexina sino todo un complejo de estas, lo que hace aún más eficaz la defensa contra los patógenos, esto puede explicar porque las fitoalexinas tienen un amplio espectro de actividad (Jankiewicz y Sobiczewski, 2003).

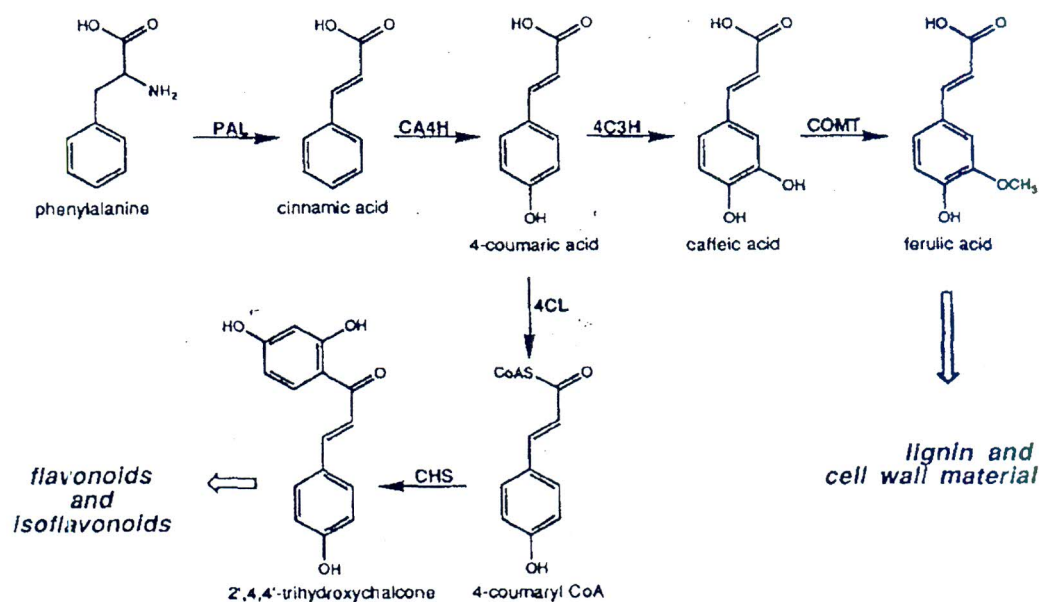
2.1.6. Actividad de PAL y POX en la resistencia a enfermedades

2.1.6.1. Fenilalanina amonio-liasa (PAL)

Una enzima que por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor en los tejidos enfermos es la fenilalanina amonio-liasa (PAL), que es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Goodman, *et al.*, 1986). Way *et al.*, (2002) al trabajar con tabaco transgénico encontraron que la fenilalanina amonio-liasa tiene un importante papel en la resistencia de las plantas.

Esta enzima cataliza la conversión de L-fenilalanina-amonio-liasa a ácido *trans*-cinámico que es el primer paso de la ruta de fenilpropanoide, que provee los precursores para los pigmentos flavonoides, lignina, los protectores UV, y las fitoalexinas

furanocoumarinas (Lewis y Yamamoto, 1990). El metabolismo fenilpropanoide (figura 4), se activa en respuesta a una amplia gama de desarrollo y las señales ambientales, y, por lo tanto, los fenilpropanoides se sintetizan durante el proceso normal de desarrollo y bajo condiciones de stress como irradiación UV, daño mecánico, o ataque el patógeno (Lawton y Lamb, 1987; Dixon y Lamb, 1990). Se sabe también que los fenilpropanoides pueden actuar como señales moleculares en procesos de reconocimiento entre *Agrobacterium* y *Rhizobium* y sus plantas hospederas (Lynn y Chang, 1990). La fluctuación en actividad de PAL se ha demostrado por ser un elemento clave que controla la síntesis de fenilpropanoides y aumenta la cantidad de ARNm en base al incremento de la actividad de PAL (Edwards *et al.*, 1985; Fritzscheier *et al.*, 1987; Lawton y Lamb, 1987; Orr *et al.*, 1993).



Fuente: Orr *et al.*, 1993.

Figura 4.- Ruta biosintética de fenilpropanoides. Las enzimas son PAL, CA4H, 4-cumarato 3 hidroxilasa (4C3H), ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT), y 4-cumarato: CoA ligasa (4CL).

Las plantas leguminosas responden a la infección por hongos patógenos o moléculas inductoras en las paredes celulares de esos patógenos, por la síntesis de fitoalexinas antimicrobiales y fenoles limitados a pared celular derivados de L-fenilalanina-amonio-liasa. La PAL cataliza el primer paso encaminado a la biosíntesis de esos compuestos relacionados con la defensa como fenilpropanoides y la conversión de la L-fenilalanina-amonio-liasa en ácido *trans*-cinámico. La respuesta de defensa de fitoalexinas implica la activación rápida de genes de transcripción que codifican un número de enzima para sintetizar fitoalexinas incluyendo la PAL (Manibhushanrao *et al.*, 1988; Dixon y Harrison, 1991). Los cambios en el contenido de fenoles totales dependen de las alteraciones y la actividad de las enzimas responsables de su biosíntesis. La PAL es importante en la síntesis de varios tipos de fenoles incluyendo los flavonoides, isoflavonoides y ácidos hidroxinámicos (Manibhushanrao *et al.*, 1988).

En células de pino, la inducción de la actividad de PAL ocurre simultáneamente con el incremento de las actividades de enzimas específicas de lignina, seguido por la deposición de la lignina en las paredes de la célula (Campbell y Ellis, 1992a, 1992b). La actividad de PAL y de otras enzimas de la ruta fenilpropanoide también se estimula altamente en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en hojas hipersensibles al virus del mosaico del tabaco (VMT) (Fritig *et al.*, 1973; Legrand *et al.*, 1976). La activación del metabolismo fenilpropanoide da lugar a la deposición de polímeros fenólicos acumulando nuevas barreras mecánicas contra la invasión del patógeno (Favali *et al.*, 1978; Legrand, 1983). Entre las enzimas del tabaco implicadas en el metabolismo fenilpropanoide, esta la OMTs (O-metiltransferasa) de la clase I y II y el alcohol cinnamil deshidrogenasa (Jaeck *et al.*, 1992; Pellegrini *et al.*, 1993).

Linke *et al.*, (2002) mencionan que el aumento en la respuesta de defensa abarca la acumulación de cinco genes de defensa relacionados (β -1,3-Glucanasa B2 y A1, Quitinasa B3 y A2, y Fenilalanina amonio-liasa) y la elicitación temprana en el aumento del peróxido de hidrógeno. En cebada, el RNAm de la PAL indicaron que el nivel del mensaje comenzó a aumentar en 0.5 h después de la inoculación con *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* y *Erysiphe pisi* (Shiraishi *et al.*, 1995).

2.1.6.2. Peroxidasa (POX)

La POX, cataliza transformaciones oxidativas de sustancias orgánicas con peróxido de hidrógeno (Van de Velde *et al.*, 2001). Esta enzima se encuentra en animales, plantas y microorganismos. En plantas se localiza parcialmente soluble en el citoplasma y parcialmente insoluble en la pared (Vamos-Vigayzó, 1981). La peroxidasa y la polifenoloxidasas catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos (Srivastava, 1987). Las funciones fisiológicas de las peroxidases en plantas no son claras, pero su intervención en reacciones peroxidativas y oxidativas, lignificación y degradación del ácido indolacético son bien conocidas (Robinson, 1991).

Existe dificultad para entender los efectos de la actividad de peroxidasa. Por ejemplo, primero, no existe como una enzima simple en frutos y vegetales; como otras enzimas vegetales, la actividad de peroxidasa se encuentra en la forma de un número de discretas isoenzimas; segundo, hay varios compuestos fenólicos que se encuentran en forma natural en todos los tejidos vegetales, cada uno de los cuales puede ser oxidado por peroxidasa en presencia de pequeñas cantidades de hidroperóxido; tercero, el intervalo de productos formados es muy extenso debido a la diversidad de compuestos que son susceptibles a oxidarse por peroxidases (Robinson, 1991).

El papel de esta enzima en la resistencia a las enfermedades probablemente se debe en gran medida a su propiedad de oxidar los compuestos fenólicos hasta quinonas, las cuales con frecuencia son mucho más tóxicas a los microorganismos que los fenoles originales, además también aumenta la velocidad de la polimerización de esos compuestos en sustancias similares a la lignina que se depositan en las paredes y papilas celulares e interfieren con el posterior crecimiento y desarrollo del patógeno (Agrios, 2001). En un trabajo realizado por Velazhahan y Vidhyasekaran (1994), encontraron que la actividad de la polifenoloxidasas y peroxidasa fue menor en las variedades susceptibles de *Arachis hypogaea* L. a *Puccinia arachidis* Speg., que en las resistentes. Luthra *et al.*, (1988) encontraron una respuesta similar en sorgo infectado con *Ramulispora sorghicola* Harris. Mozzetti *et al.*, (1995) encontraron un aumento temprano en la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y peroxidasa en líneas resistentes de chile pimiento, en contraste con las líneas susceptibles. En plántulas de tomate a 27 °C el aumento en la actividad de peroxidasa se debió al aumento de la actividad de enzimas relacionadas y a la incidencia de *Meloidogyne incógnita* (Zacheo *et al.*, 1995). La actividad de peroxidasa (POX) fue la más alta a los 2 días después de la infección en trigos resistentes, pero aumentó más lentamente a un pico en 6 días después de la infección en el trigo susceptible (Gogoi *et al.*, 2001).

La peroxidasa actúa en la generación de O_2^- y ocurre en tejidos finos sanos para proporcionar H_2O_2 para la lignificación. La implicación de peroxidasas en la inducción del elicitor para la generación de la explosión oxidativa es sugerida por la formación reducida de peróxidos lípidos y compuestos fenólicos en células de tomate en presencia de cianuro y ácido salicilhidroxámico, dos inhibidores de peroxidasas que se conocen (Vera-Estrella *et al.*, 1992).

2.2. El tizón tardío de la papa

Entre las enfermedades que afectan a la papa (*Solanum tuberosum* L), el “tizón tardío” causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary es la enfermedad más devastadora de plantas reportadas en la historia de la humanidad (Abad y Abad 1995). Está presente en todas las áreas paperas del mundo y es considerada como la mas importante del cultivo de la papa, porque si el cultivo no esta protegido adecuadamente con aplicaciones planificadas de fungicidas y por otra parte, las condiciones ambientales donde se desarrollan los cultivos, son al mismo tiempo óptimas para el desarrollo del patógeno (temperatura de 12 a 15 °C y humedad relativa de 80 a 100%), los campos de papa pueden ser destruidos en un lapso de 10 a 15 días. Esto es lo que ocurre en algunas zonas paperas de México y del mundo, donde las pérdidas pueden ser totales (Abad y Abad 1995). La papa (*Solanum tuberosum* L.), pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) son las plantas hospedantes mas importantes del patógeno. Ocasionalmentē afecta a la berenjena (*Solanum melongena*), y a otras plantas que pertenecen a la familia Solanaceae y especies de *Solanum* (Abad *et al.*, 1995).

Este oomiceto es una especie heterotática que se ha propuesto como originaria del Valle de Toluca, México (Gallegly y Galindo, 1958; Goodwin, 1996). En años recientes se descubrió la aparición del grupo de compatibilidad A2, las poblaciones de otros países contenían hasta antes de 1980 solo la línea clonal A1 (Flier *et al.*, 2002).

2.3. Control genético

El mejoramiento para obtener nuevas variedades resistentes al tizón tardío se inició después de la epifitia causada en 1845 en Irlanda (Dowley, 1995). Desde entonces hasta la fecha, los científicos de todas partes del mundo involucrados en el cultivo de la papa,

continúan trabajando en la generación de variedades resistentes al tizón tardío, porque la resistencia sucumbe debido a la aparición de aislamientos más agresivos de origen sexual. Vanderplank (1963) estableció la diferencia entre resistencia monógena y póligena, usando el término resistencia vertical y horizontal, respectivamente.

2.3.1. Resistencia vertical

Llamada también resistencia cualitativa. Las plantas de papa que tienen esta resistencia, son resistentes solamente a un número determinado de razas del patógeno. Esta resistencia está gobernada por genes mayores conocidos como genes R, los cuales fueron incorporados a las variedades con este tipo de resistencia, al utilizar como uno de los progenitores, a la especie silvestre *Solanum demissum*, la cual tiene genes mayores dominantes. Desafortunadamente, la resistencia tiene corta duración en el campo, porque sucumben ante la aparición de nuevas razas (Jaramillo y Rojas, 1997).

Para que exista resistencia vertical, debe haber genes simples de resistencia en las plantas y también genes simples de actividad parasítica en el parásito. Éste es un fenómeno muy importante conocido como relación gene-gene, descubierta en 1940 por H. H. Flor, en los Estados Unidos (Robinson, 1996).

2.3.2. Resistencia horizontal

Conocida también como resistencia cuantitativa o de campo, está gobernada por genes menores (r) y por otros factores como algunas características de la planta (grosor de la cutícula de la hoja) y/o la presencia de sustancias que inhiben el desarrollo del patógeno. Las plantas que tienen este tipo de resistencia se infectan en el campo, pero los daños y el porcentaje del área de infección son mucho menores que en una planta susceptible.

La resistencia horizontal es estable en el tiempo y en el espacio. Cuando una variedad con resistencia horizontal es expuesta en el campo en condiciones muy favorables para el patógeno y a una alta presión de inóculo, la resistencia se perderá y la variedad se comportará como susceptible, pero, la resistencia se mantiene y la variedad volverá a comportarse como resistente en ambientes menos favorables para *P. Infestans* (Jaramillo y Rojas, 1997; Robinson, 1996).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento

La presente investigación se llevó a cabo durante el verano de 2003 en los campos experimentales del PICTIPAPA (Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa) en el Valle de Toluca, Estado de México y en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en Chapingo, Estado de México.

3.2. Material vegetal

Se utilizaron tres Clones de papa con resistencia a *Phytophthora infestans*: A00531-21, A00502-3, A00499-5 y dos variedades comerciales, Alpha y Zafiro que presentan susceptibilidad y mediana resistencia al ataque de *Phytophthora infestans*, respectivamente.

3.3. Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental, consistió de un surco de 1.2 metros de largo con separaciones de un metro entre bloques, con dos plantas de cada material por surco y a las orillas con una planta de Alpha. Los tratamientos fueron; T₁: Alpha sin fungicida como testigo; T₂: Alpha con fungicida; T₃ Zafiro sin fungicida; T₄: Zafiro con fungicida; T₅: A00531-21 sin fungicida; T₆: A00531-21 con fungicida; T₇: A00502-3 sin fungicida; T₈: A00502-3 con fungicida; T₉: A00499-5 sin fungicida; T₁₀: A00499-5 con fungicida.

3.4. Desarrollo del experimento y variables evaluadas

La siembra se llevó a cabo el 30 de Junio del 2003 en condiciones de temporal. La siembra fue a 30 cm entre plantas, la distancia entre surcos fue de 90 cm y la profundidad de 10 cm.

Al momento de la plantación se aplicó la mezcla de BENLATE® (1 kg i.a. ha⁻¹), CAPTAN® (1 kg i.a. ha⁻¹) e IMIDACLOPRID® (350 g i.a. ha⁻¹) a la semilla (tubérculo) y se fertilizó con la fórmula 120-180-120 más 20 kg de Ca y 10 kg de Mg por hectárea. Se aplicó PARAQUAT® un herbicida postemergente a una dosis de 850 ml ha⁻¹. Una semana después de la siembra se aplicó metribuzin 525 g i.a. ha⁻¹. La segunda fertilización (60 kg de N ha⁻¹) se realizó el 28 de Julio del 2003 al momento de la escarda. Se realizaron aplicaciones semanales de insecticidas y fungicidas en rotación. Los insecticidas fueron FOLIDOL (1 l ha⁻¹), METASYXTOX (1 l ha⁻¹), THIODAN (1.5 l ha⁻¹), TAMARON (1 l ha⁻¹), y FOLIMAT (600 ml ha⁻¹); y los fungicidas ACROBAT (2.5 kg ha⁻¹), RIDOMIL GOLD (2.5 kg ha⁻¹), CURZATE (2 kg ha⁻¹)-MANZATE (3 kg ha⁻¹), MANCOLOXIL 72 (2.5 kg ha⁻¹)-RAKSHA (3 kg ha⁻¹) y BRAVO 720 (2 l ha⁻¹)-MANZATE (3 kg ha⁻¹). A los 30 días después de la siembra se tomó el primer muestreo de folíolos al azar, tomando 20 g de la planta en total de cada tratamiento y se llevaron al laboratorio para su análisis, manteniéndolos a una temperatura aproximada de 4 °C. Este procedimiento se repitió cada semana hasta llegar a la fase de inicio de tuberización de la planta, siendo un total de seis muestreos tomando en cada uno el porcentaje de infección de acuerdo a la metodología propuesta por Henfling (1987). Las variables evaluadas fueron porcentaje de infección de la enfermedad (tizón tardío, infección natural), actividad enzimática de PAL y POX, y concentración de fenoles.

3.5. Trabajo de laboratorio

Las determinaciones realizadas en el laboratorio se hicieron utilizando polvo de acetona el cual se obtuvo a partir de 20 g de hojas + 50 ml de acetona 100 % (4 °C) molidas en licuadora y filtradas al vacío descartándose la acetona. Este proceso se repitió dos veces más con el tejido, y se dejó secar a temperatura de laboratorio (18 °C) y se almacenó a - 4 °C hasta el ensayo de las enzimas PAL y POX (Alia-Tejacal *et al.*, 2002). El sobrenadante se utilizó para la determinación de fenoles totales de acuerdo al método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994).

3.5.1. Determinación de fenoles

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

3.5.2. POX

La actividad de la POX se determinó mediante la metodología descrita por Alia-Tejacal *et al.*, (2002) con algunas modificaciones, la enzima se extrajo a partir de 0.1 g de polvo de acetona con 5 ml de Tris-HCl frío (pH 7.1) conteniendo 1 % de polivinilpirrolidona. Se mezclaron en un homogenizador de tejidos durante 50 segundos, posteriormente la mezcla se centrífugo por 20 min a 12,500 rpm a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo de acuerdo con Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: la mezcla de ensayo fue con un volumen total de 3 ml, 2.6 ml de amortiguador Tris-HCl (pH 7.1), 0.25 ml de

guayacol 0.1 M, 0.1 ml de peróxido de hidrógeno 0.25 % y 0.05 ml del sobrenadante. Se evaluó el cambio de absorbancia a los 30, 60, 120 y 180 segundos a 470 nm. La actividad enzimática se reporta como $U\ g^{-1}\ p. f.$ donde U = Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de $1\ mmol\ min^{-1}$ de tetraguayacol.

3.5.3. PAL

La PAL se extrajo con el método descrito por Martínez-Tellez y Lafuente (1997), a partir de 0.1 g de polvo de acetona con 5 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8) frío + 20 mM β -mercaptoetanol, mezclándose en el homogenizador de tejidos durante 50 segundos. A continuación se agitó la mezcla durante 20 min en baño con hielo (4 °C), posteriormente se filtró usando embudo de plástico y malla de tela, enseguida se centrifugó a 12,500 rpm a 4 °C durante 20 min. Se extrajo el sobrenadante, la enzima se precipitó agregando 0.46 g de sulfato de amonio por cada mililitro de sobrenadante y se agitó durante 30 minutos a 4 °C. Se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 12,500 rpm a 4 °C. Se utilizó el precipitado y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se redisolvió agregando 5 ml de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8), siendo este extracto final el que se usó para el ensayo. El ensayo enzimático se realizó de acuerdo con Arz y Grambow (1995) con algunas modificaciones; la mezcla para el ensayo consistió de 1.8 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8), 0.9 ml del extracto final, preincubado a 40 °C por 5 min. Posteriormente se agregan 0.3 ml de L-fenilalanina 100 mM y se midió la absorbancia a 290 nm. Simultáneamente se llevó a cabo el ensayo de una repetición de la muestra con 2.1 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8) y 0.9 ml del extracto final. Se evaluó el cambio de absorbancia en 2 h a 290 nm a luz ultravioleta, manteniendo la muestra en baño maría a 40 °C. La actividad enzimática se reporta como $U\ g^{-1}\ p. f.$ donde $U = \Delta$ (absorbancia) a 290 nm/h.

3.6. Análisis de resultados.

El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante los programas SAS (Statistical Analysis System), Sigma Plot 2000 y Excel. Se aplicaron análisis de comparaciones de medias y correlaciones y se elaboraron gráficas de comportamiento de las diferentes variables evaluadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Porcentaje de infección

Como era de esperarse la variedad susceptible Alpha sin y con fungicida presentó los valores más altos de infección en cada muestreo terminando con un 98 y 45 % de follaje dañado respectivamente, sin llegar a tuberización en el tratamiento sin fungicida (Fig. 5), situación que coincide con los datos reportados por Lozoya y Hernández (2001) (Apéndice 2, cuadro 1). Al mismo tiempo, la variedad Zafiro sin fungicida se comportó como medianamente resistente, lo que concuerda con Rubio *et al.*, (2001) quienes reportan valores del 10 al 80% de infección en el primer y sexto muestreo, debido a la severidad de incidencia del tizón tardío (Fig. 5, A).

Zafiro con fungicida presentó valores menores al 10 % de infección, debido a la influencia de los fungicidas sobre el patógeno y a la resistencia genética de esta variedad; teniendo el mismo comportamiento que los clones A00502-3 y A00499-5 sin y con fungicida (Fig. 5), pues, éstos terminaron el ciclo de cultivo con valores por abajo del 5% y 10% respectivamente, con excepción del clon A00531-21 sin fungicida que presentó un porcentaje de infección del 23% en el último muestreo sin diferencia significativa estadísticamente con los clones A00502-3 y A00499-5. Sin y con protección química, los clones evaluados se comportaron como resistentes al ataque de *Phytophthora infestans*, estos resultados también son similares a los reportados por Lozoya *et al.*, (2002).

Durante el desarrollo del cultivo se presentaron condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo del patógeno, es decir, una humedad relativa de 75-95% y una temperatura alrededor de los 15 °C (Abad y Abad 1995) (Apéndice 1).

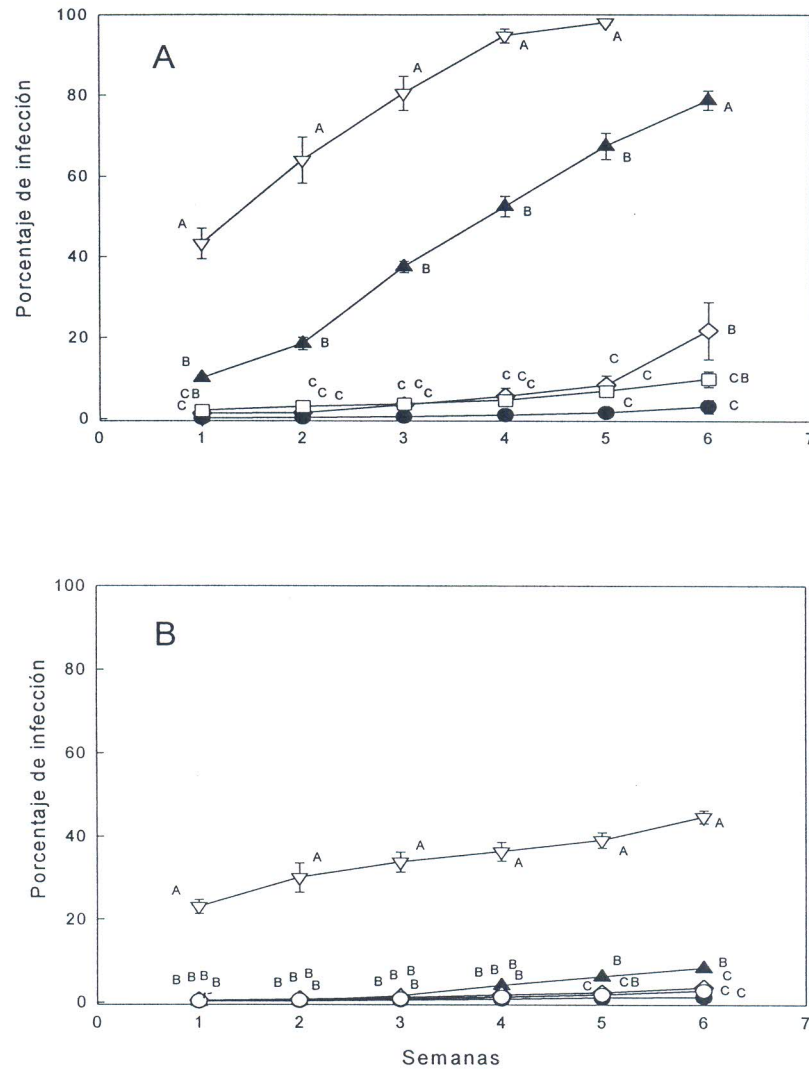


Figura 5.- Porcentaje de infección en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida: ▽ Alpha; ▲ Zafiro; ◇ A00531-21; ● A00502-3; □ A00499-5. Medias con letras similares dentro de cada muestreo son estadísticamente iguales, Tukey, $P \leq 0.05$; cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

4.2. Fenoles totales

Se registró un aumento en el contenido de fenoles totales de acuerdo al aumento del porcentaje de infección en cada uno de los materiales evaluados sin y con fungicida (Fig. 6). De acuerdo con Strack (1997) y Agrios (2001), los fenoles son de gran importancia y algunos se pueden acumular como fitoalexinas como resultado del ataque de microorganismos contribuyendo a la resistencia de enfermedades, muchos fenoles y la oxidación de sus productos como las quinonas son altamente tóxicos al patógeno (Vidhyasekaran, 1988).

En los tratamientos sin fungicida, el valor más bajo en concentración de fenoles en el muestreo uno fue en la variedad Alpha de $0.18701 \text{ mg g}^{-1}$ de p. f. (p. f.) y el valor más alto fue para el clon A00499-5 con $0.43604 \text{ mg g}^{-1}$ p. f., sin ser estadísticamente diferente a Zafiro ($0.37235 \text{ mg g}^{-1}$ p. f.) contrario a lo que ocurrió en los clones A00531-21 ($0.36069 \text{ mg g}^{-1}$ p. f.) y A00502-3 ($0.34352 \text{ mg g}^{-1}$ p. f.) (Fig. 6, A). Posteriormente Zafiro mantuvo una concentración de fenoles totales mayor en relación a los demás materiales teniendo su máximo valor en el muestreo cinco con $0.72859 \text{ mg g}^{-1}$ p. f. sin ser estadísticamente diferente al clon A00499-5 ($0.60985 \text{ mg g}^{-1}$ p. f.) el cual, con excepción del muestreo tres, mantuvo un comportamiento similar a Zafiro. En el muestreo final no hubo diferencias significativas entre tratamientos. La acumulación de compuestos fenólicos durante la infección por patógenos ha sido reportada como alta en plantas resistentes y baja en plantas susceptibles (Arora y Wagle, 1985; Patil *et al.*, 1985; Bashan, 1986 y Luthra *et al.*, 1988; Velazhahan y Vidhyasekaran, 1994).

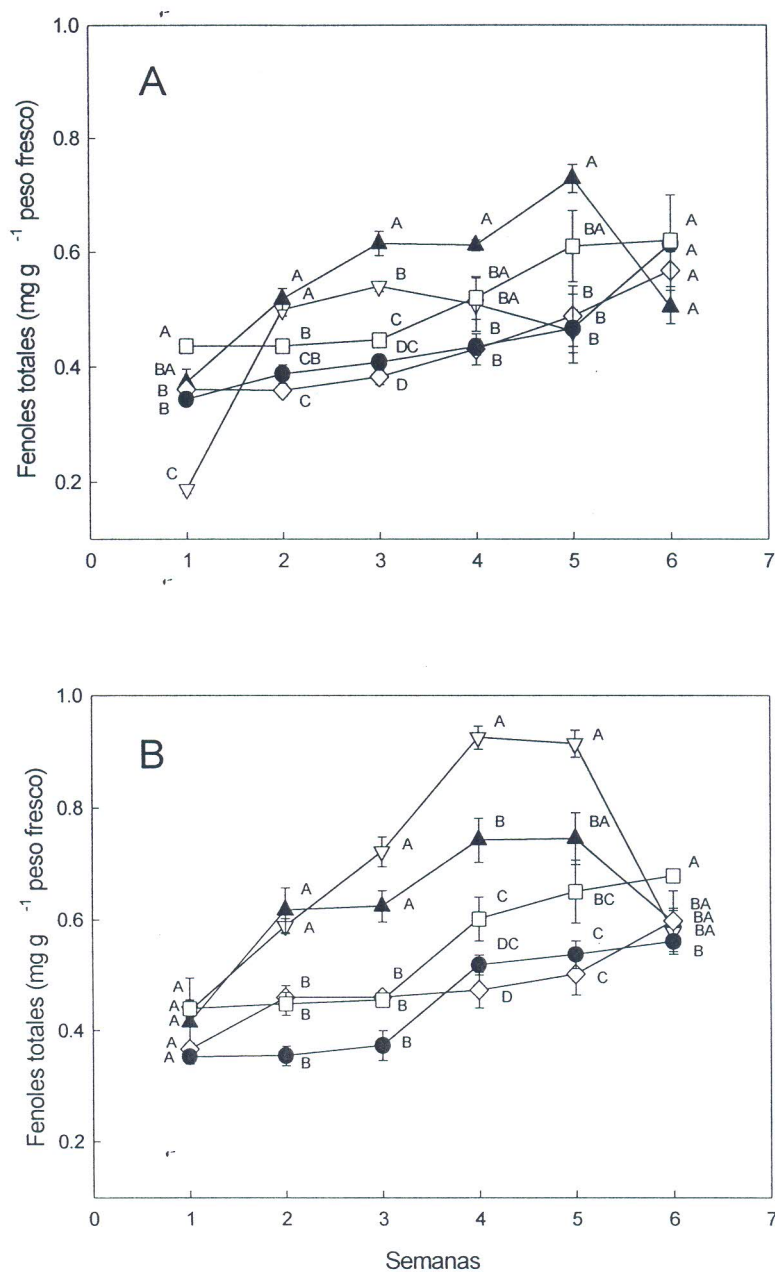


Figura 6.- Concentración de fenoles totales en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida: ∇ Alpha; $\blacktriangle$ Zafiro; $\diamond$ A00531-21; $\bullet$ A00502-3; $\square$ A00499-5. Medias con letras similares dentro de cada muestreo son estadísticamente iguales, Tukey, $P \leq 0.05$; cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

En Alpha sin protección química, la concentración de fenoles totales fue mayor en los clones A00531-21 y A00502-3 a las seis, siete y ocho semanas a partir de la siembra, y ligeramente superior al clon A00499-5 en el muestreo siete (etapa vegetativa). La alta concentración de fenoles totales en Alpha probablemente se debió a la alta infección por el tizón (60 a 95 %) en ese tiempo, es probable que tal concentración de fenoles en sí no halla sido suficiente para detener el ataque del oomiceto en esta variedad. Andreu *et al.*, (2000) mencionan que la resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno. En el muestreo seis Alpha presentó un porcentaje de infección foliar del 98 % disminuyendo drásticamente la concentración de los fenoles de 0.53946 mg g⁻¹ p. f. en el muestreo tres a 0.46158 mg g⁻¹ p. f. en el muestreo cinco. En el primer muestreo Alpha tuvo la menor cantidad de fenoles totales (0.18701 mg g⁻¹ p. f.) dando lugar a la invasión y establecimiento del oomiceto, aunque después la síntesis de fenoles aumentó. Como lo menciona Ryals (1994), la resistencia de la planta a enfermedades de patógenos tales como hongos, bacterias, y virus depende a menudo de si la planta puede reconocer al patógeno temprano en el proceso de la infección, esta resistencia en muchos casos se manifiesta por una restricción en la multiplicación y movimiento del patógeno, a un área pequeña alrededor del punto de infección, en esta parte aparece una lesión necrótica como respuesta de la planta a la infección (RH) que puede inducir la resistencia sistémica adquirida (RSA). También es importante el tipo de compuestos fenólicos formados como lo menciona Vidhyasekaran (1988), fenoles como las quinonas son altamente tóxicos al patógeno. Gogoi *et al.*, (2001) encontraron hidroquinona solo en trigo resistentes mientras que en susceptibles identificaron ácido caféico.

Respecto a los clones A00531-21 y A00502-3 la concentración de fenoles fue de 0.36069 y 0.34352 mg g⁻¹ p. f. y mantuvieron una tendencia lineal llegando a valores de 0.56678 y 0.61377 mg g⁻¹ p. f. respectivamente, sin presentar diferencias estadísticas entre ellos (Fig. 6, A).

La concentración de fenoles en los clones con fungicida fue similar a través del tiempo, manteniendo una tendencia lineal (en la mayoría de los casos) con valores en el primer muestreo de 0.43968, 0.36564 y 0.35201 mg g⁻¹ p. f. y en el muestreo final de 0.67856, 0.59745 y 0.56078 mg g⁻¹ p. f. para A00499-5, A00531-21 y A00502-3, respectivamente (Fig. 6, B). Alpha con fungicida tuvo los valores más altos durante los muestreos 2 al 4 con valores máximos en los muestreos cuatro y cinco con 0.92451 y 0.91353 mg g⁻¹ p. f. respectivamente.

Con protección química, Zafiro mantuvo una tendencia estadísticamente similar a Alpha. Estas variedades superaron en concentración de fenoles totales a los clones. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Arora y Wagle (1985); Patil *et al.*, (1985); Bashan (1986) y Velazhahan y Vidhyasekaran (1994); mencionando que la acumulación de compuestos fenólicos durante la infección por patógenos es alta en plantas resistentes y baja en plantas susceptibles. Este efecto puede ser atribuido a una mayor respuesta en la síntesis de fenoles por la aplicación de fungicidas los cuales aparentemente indujeron la síntesis de fitoalexinas y por lo tanto un aumento en la concentración de fenoles, sin embargo estos fenoles no resultan ser altamente tóxicos para el oomiceto. Existen algunos reportes donde la síntesis de fitoalexinas fue correlacionada con la aplicación de fungicidas como el metalaxil usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea (Cahill y Ward 1989) y el Fosetyl-Al correlacionando su acción curativa con acumulación de la fitoalexina resveratrol en la vid (Dercks y Creasy 1989).

En general la concentración de fenoles en las variedades y clones con aplicación de fungicida fueron mayores en relación a los materiales sin aplicación, esto puede ser debido a lo mencionado anteriormente (Fig. 6; Apéndice 2, cuadro 2).

4.3. Actividad de POX

La actividad de esta enzima en el primer muestreo fue estadísticamente igual en cada uno de los materiales sin fungicida (Fig. 7, A). En Zafiro aumentó durante el proceso de desarrollo del cultivo así como la infección por tizón, manteniendo los niveles de actividad mayor en relación a los clones resistentes, particularmente en el muestreo cinco ($5903.4 \text{ U g}^{-1} \text{ p. f.}$). Por su parte, la alta actividad de Alpha en el segundo y tercer muestreo (4692.9 y $5176.8 \text{ U g}^{-1} \text{ p. f.}$, respectivamente) fué estadísticamente igual a Zafiro. Al parecer la actividad elevada de Alpha y Zafiro puede deberse a una mayor cantidad de sustrato como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Robinson, 1991), el cual se produce durante la respiración que pudiera aumentar debido al estrés causado por la infección del hongo dando lugar a una mayor síntesis de etileno. Esto es respaldado por Boller (1982), dicho autor menciona que el etileno aumenta bruscamente durante el estrés y cuando éste estrés es causado por la infección de un patógeno, el etileno puede iniciar la producción de fitoalexinas.

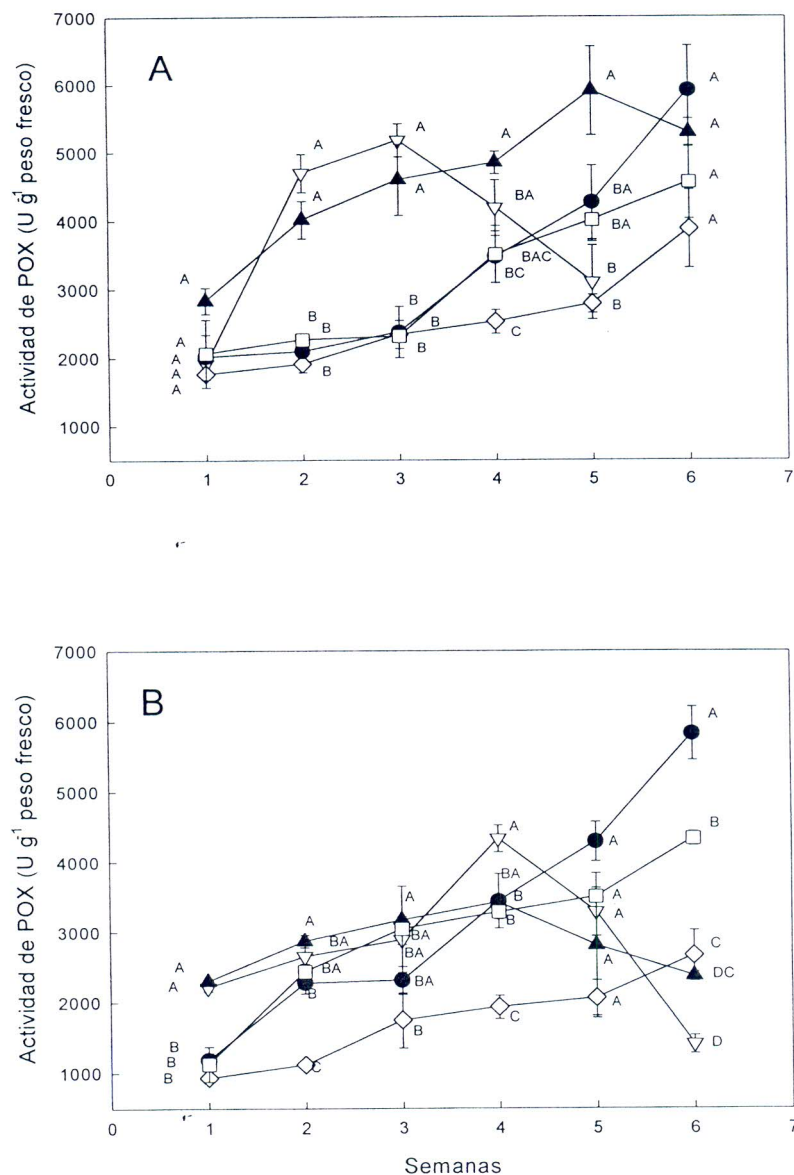


Figura 7.- Actividad de POX en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida: ▽ Alpha; ▲ Zafiro; ◇ A00531-21; ● A00502-3; □ A00499-5. Medias con letras similares dentro de cada muestreo son estadísticamente iguales, Tukey, $P \leq 0.05$; cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Velazhahan y Vidhyasekaran (1994); ellos encontraron que la actividad de la polifenoloxidasas y peroxidasa fue menor en las variedades susceptibles de *Arachis hypogaea* L. a *Puccinia arachidis* Speg., que en las resistentes. Luthra *et al.*, (1988) encontraron una respuesta similar en sorgo infectado con *Ramulispora sorghicola* Harris. Mozzetti *et al.*, (1995) encontraron un aumento temprano en la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y peroxidasa en líneas resistentes de chile pimiento, en contraste con las líneas susceptibles. Además de lo mencionado anteriormente, esto podría deberse a que hay una interacción de la peroxidasa con un mayor número de enzimas relacionadas con la peroxidasa aumentando el nivel de actividad como lo mencionan Zacheo *et al.*, (1995), en plántulas de tomate a 27 °C el aumento en la actividad de peroxidasa se debió al aumento de la actividad de enzimas relacionadas y a la incidencia de *Meloidogyne incognita* (Zacheo *et al.*, 1995). La disminución de POX en Zafiro y Alpha sin fungicida se debe posiblemente al alto porcentaje de infección final alcanzado, 80 y 98 %, respectivamente (Fig. 5, A), eliminándose gran parte del follaje y además, por estar en la fase final de su ciclo fenológico. La actividad de POX en los clones sin fungicida mantuvieron un comportamiento estadísticamente igual durante el desarrollo del experimento, con valores en el primer muestreo de 2065.2 (A00499-5), 2012.4 (A00502-3) y 1907.2 (A00531-21) U g⁻¹ y en el sexto muestreo de 4558.2, 5907.6 y 3876.1 U g⁻¹ p. f., en los clones A00499-5, A00502-3 y A00531-21, respectivamente. El clon A00502-3 fue el que presentó mayor actividad de POX durante el desarrollo del experimento sin ser estadísticamente mayor a los clones A00499-5 y A00531-21 (Fig. 7, A).

La actividad de la POX en Alpha y Zafiro con fungicida en el primer muestreo fue mayor en relación a los clones (Fig. 7, B). Sin embargo la actividad de esta enzima en cada clon fue en aumento hasta superar a las variedades comerciales. El valor más alto registrado en el muestreo seis fue para A00502-3 ($5823.9 \text{ U g}^{-1} \text{ p. f.}$), seguido por A00499-5 ($4331.9 \text{ U g}^{-1} \text{ p. f.}$). Cabe destacar que la actividad de POX en los clones se comportó de manera similar sin y con aplicación de fungicida. No así las variedades comerciales, las cuales presentaron mayor actividad de POX cuando no hubo aplicación de fungicida, lo que concuerda con Boller (1982).

4.4. Actividad de PAL

La actividad de PAL en los clones y variedades sin fungicida fue muy baja y similar entre hospedantes durante los primeros tres muestreos, sin haber diferencias significativas entre sus medias lo que indica que la resistencia sistémica adquirida se encuentra en la etapa de reconocimiento del patógeno para inducir la actividad de PAL y por lo tanto síntesis de fitoalexinas (Fig. 8, A). Zafiro y A00531 aumentaron significativamente en los tres muestreos posteriores con valores de 0.39014 y $0.36257 \text{ U g}^{-1} \text{ p. f.}$ respectivamente en el sexto muestreo. En los clones A00502-3 y A00499-5, la actividad de PAL mantuvo un comportamiento estadísticamente igual a Zafiro y A00531-21, aunque con valores relativamente más bajos. En Alpha sin fungicida la actividad de esta enzima fue baja durante los primeros tres muestreos, disminuyendo a partir del cuarto muestreo, en contraste con los demás materiales que aumentaron la actividad de PAL durante el desarrollo del cultivo, lo cual posiblemente se debió al alto porcentaje de infección alcanzado (95 y 98 % respectivamente), eliminando gran parte del follaje (Fig. 5, A).

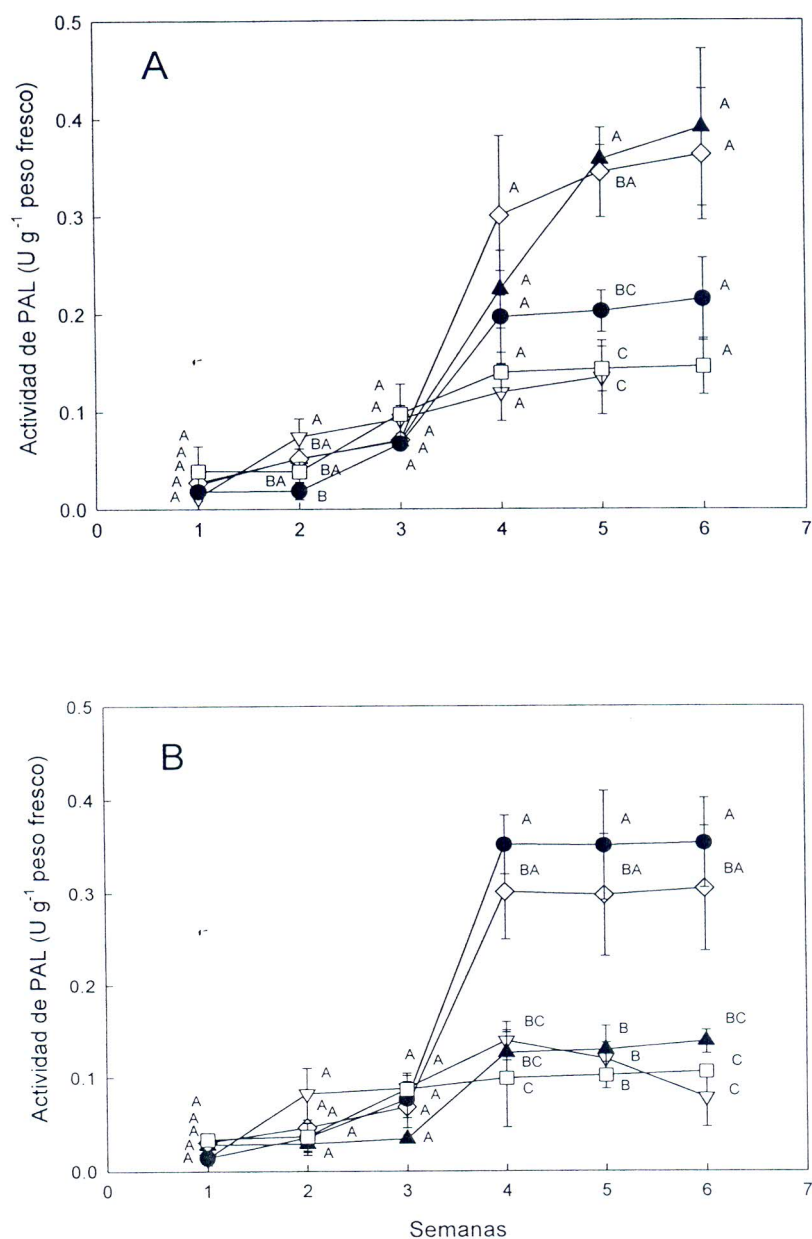


Figura 8.- Actividad de PAL en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicida: ▽ Alpha; ▲ Zafiro; ◇ A00531-21; ● A00502-3; □ A00499-5. Medias con letras similares dentro de cada muestreo son estadísticamente iguales, Tukey, $P \leq 0.05$; cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

Estos resultados concuerdan con Mozzetti *et al.* (1995), quienes encontraron un aumento temprano en la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y peroxidasa en líneas resistentes de chile pimiento, en contraste con las líneas susceptibles. En plantas resistentes de cebada, los niveles de RNAm de la PAL indicaron que se inició un aumento 0.5 h después de la inoculación con *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* y *Erysiphe pisi* (Shiraishi *et al.*, 1995). También se menciona que en los tejidos enfermos, hay mayor actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), que es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Goodman, *et al.*, 1986).

La actividad de PAL en Zafiro con fungicida fue muy baja en relación al tratamiento Zafiro sin fungicida lo que indica que cuando hubo eliminación del patógeno por efecto del fungicida la actividad de PAL se mantuvo, ya que la planta no detectó la presencia del patógeno para inducir la actividad de PAL y por lo tanto síntesis de fitoalexinas (Fig. 8, B). Por su parte Alpha y A00499-5 mantuvieron un comportamiento similar en el tratamiento con y sin fungicida, puede ser que el clon A00499-5 sea capaz de detener el ataque del patógeno con poca actividad de PAL debido a una buena eficiencia en sus procesos bioquímicos de defensa. De igual manera, la actividad de PAL en A00531-21 se mantuvo muy similar en el tratamiento con y sin fungicida, es decir, el clon A00531-21 detuvo el ataque del patógeno con la actividad de PAL registrada. Aunque cuando no hubo aplicación de fungicida el porcentaje de infección llegó hasta 23 % sin ser muy significativa.

Por otra parte, la actividad de PAL en el clon A00502-3 aumentó drásticamente cuando se aplicó fungicida, (Fig. 8, B). Se sabe que algunos pesticidas aplicados contra patógenos también pueden inducir la producción de fitoalexinas. Cahill y Ward (1989) reportan que el “Metalaxyl” usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea en soya, liberaba de su micelio los elicitores de la gliceolina aumentando la síntesis de ésta fitoalexina.

Por su parte Dercks y Creasy (1989) correlacionaron la acción curativa de Fosetyl-Al con el nivel de acumulación de la fitoalexina resveratrol en la vid. Por otro lado Trujillo *et al.*, (2001) determinaron el efecto del activador de resistencia Bion 50 WG como estrategia de control químico del tizón tardío para cultivares resistentes, y el control de manchas foliares fungosas y rizoctoniasis obteniendo resultados positivos.

Aparentemente los fungicidas aplicados a las variedades indujeron la síntesis de fenoles y en menor proporción en los clones evaluados. La actividad de la POX al parecer se redujo en Zafiro y muy poco en Alpha, manteniéndose de forma similar sin y con aplicación de fungicida en los clones. Y finalmente la actividad de la PAL solo aumentó significativamente en el clon A00502-3, manteniendo la misma tendencia en los demás materiales en relación a los tratamientos sin fungicida (Ver apéndice 2, cuadro 4).

4.5. Análisis de correlación

Las correlaciones entre variables para cada material se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0.05$. Las graficas de tendencia respectivas se pueden observar a en el apéndice 3a - 3e. Los resultados para Alpha sin y con fungicida se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Correlación entre variables para Alpha.

	Variables	% Infección	Fenoles	POX	PAL
S/F ⁺	% Infección	1.0000	0.7477 ^{ns}	0.4105 ^{ns}	0.9860*
	Fenoles		1.0000	0.8998*	0.7996 ^{ns}
	POX			1.0000	0.4632 ^{ns}
	PAL				1.0000
C/F ⁺⁺	% Infección	1.0000	0.4963 ^{ns}	-0.0500 ^{ns}	0.6291 ^{ns}
	Fenoles		1.0000	0.8130*	0.9380*
	POX			1.0000	0.7137 ^{ns}
	PAL				1.0000

* Nivel de significancia $\alpha=0.05$. POX: Peroxidasa, PAL: Fenilalanina-amonio-liasa. ns: No significativo.

+ S/F: sin fungicida; ++ C/F: con fungicida.

Las correlaciones significativas en el tratamiento sin fungicida fueron para % Infección/PAL ($r=0.9860^*$) y Fenoles/POX ($r=0.8998^*$). La correlación % Infección/Fenoles obtuvo un valor de $r=0.7477$, sin ser estadísticamente significativa. La acumulación de compuestos fenólicos durante la infección por patógenos ha sido reportada como alta en plantas resistentes y baja en plantas susceptibles (Arora y Wagle, 1985; Patil *et al.*, 1985; Bashan, 1986; Velazhahan y Vidhyasekaran, 1994).

En el tratamiento con fungicida hubo significancia en la correlación Fenoles/POX y Fenoles/PAL, con coeficientes de correlación de $r=0.8130^*$ y $r=0.9380^*$ respectivamente. Esta correlación de Fenoles/PAL esta ligada a la síntesis de fitoalexinas, de acuerdo con Goodman, *et al.* (1986), y como ya se mencionó la PAL es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina. Cabe destacar la correlación % Infección/PAL con valor de $r=0.6291$, sin embargo no es significativa. La respuesta de defensa de fitoalexinas implica la activación rápida de genes de transcripción que codifican un número de enzimas biosintéticas de fitoalexinas incluyendo la PAL (Manibhushanrao *et al.*, 1988; Dixon y Harrison, 1991). Asimismo la correlación POX/PAL presentó un valor de $r=0.7137$, sin resultar significativo.

En el Cuadro 2 se pueden observar las correlaciones entre variables para Zafiro, en donde el tratamiento sin fungicida, muestra correlaciones significativas altas para % Infección/POX ($r=0.9095^*$), % Infección/PAL ($r=0.9643^*$), Fenoles/POX ($r=0.8462^*$) y POX/PAL ($r=0.8560$). La correlación no significativa % Infección/Fenoles tuvo un coeficiente de correlación positiva mayor en relación al tratamiento con fungicida. En el tratamiento con fungicida, destaca la correlación significativa entre % Infección/PAL ($r=0.9335^*$), así como la correlación entre Fenoles/POX ($r=0.7208$) y Fenoles/PAL ($r=0.6264$), aunque no tuvieron significancia estadística. El % Infección/Fenoles tuvo una correlación positiva pero muy baja ($r=0.4833$). Por lo que hubo poca relación directa entre estas variables.

Cuadro 2. Correlación entre variables para Zafiro.

	Variables	% Infección	Fenoles	POX	PAL
S/F⁺	% Infección	1.0000	0.5783 ^{ns}	0.9095*	0.9643*
	Fenoles		1.0000	0.8462*	0.4981 ^{ns}
	POX			1.0000	0.8560*
	PAL				1.0000
C/F⁺⁺	% Infección	1.0000	0.4833 ^{ns}	-0.1320 ^{ns}	0.9335*
	Fenoles		1.0000	0.7208 ^{ns}	0.6264 ^{ns}
	POX			1.0000	0.0807 ^{ns}
	PAL				1.0000

* Nivel de significancia $\alpha=0.05$. POX: Peroxidasa, PAL: Fenilalanina-amonioliasa. ns: No significativo.

+ S/F: sin fungicida; ++ C/F: con fungicida.

Los clones estudiados sin y con protección química presentaron correlaciones positivas entre cada variable (Porcentaje de infección, Fenoles, POX y PAL), con coeficientes de correlación mayores de $r=0.7600$. Este se puede apreciar claramente en los Cuadros 3, 4, y 5, lo cual indica que los clones presentan un mejor equilibrio en los mecanismos de defensa contra *Phytophthora infestans*, por lo tanto existe una mayor reacción de hipersensibilidad y un establecimiento relativamente rápido de la RSA.

Cuadro 3 .- Correlación entre variables para A00531-21.

	Variables	% Infección	Fenoles	POX	PAL
S/F⁺	% Infección	1.0000	0.9574*	0.9786*	0.7708 ^{ns}
	Fenoles		1.0000	0.9720*	0.9062*
	POX			1.0000	0.8397*
	PAL				1.0000
C/F⁺⁺	% Infección	1.0000	0.9384*	0.9681*	0.8611*
	Fenoles		1.0000	0.9158*	0.7335 ^{ns}
	POX			1.0000	0.8565*
	PAL				1.0000

* Nivel de significancia $\alpha=0.05$. POX: Peroxidasa, PAL: Fenilalanina-amonio-liasa. ns: No significativo.
+ S/F: sin fungicida; ++ C/F: con fungicida.

Cuadro 4 .- Correlación entre variables para A00502-3.

	Variables	% Infección	Fenoles	POX	PAL
S/F⁺	% Infección	1.0000	0.9879*	0.9882*	0.8096 ^{ns}
	Fenoles		1.0000	0.9670*	0.7879 ^{ns}
	POX			1.0000	0.8837*
	PAL				1.0000
C/F⁺⁺	% Infección	1.0000	0.9450*	0.9802*	0.9094*
	Fenoles		1.0000	0.9171*	0.9899*
	POX			1.0000	0.8728*
	PAL				1.0000

* Nivel de significancia $\alpha=0.05$. POX: Peroxidasa, PAL: Fenilalanina-amonio-liasa. ns: No significativo.
+ S/F: sin fungicida; ++ C/F: con fungicida.

Cuadro 5 .- Correlación entre variables para A00499-5.

	Variables	% Infección	Fenoles	POX	PAL
S/F⁺	% Infección	1.0000	0.9347*	0.9472*	0.8003 ^{ns}
	Fenoles		1.0000	0.9801*	0.8613*
	POX			1.0000	0.8912*
	PAL				1.0000
C/F⁺⁺	% Infección	1.0000	0.9312*	0.8982*	0.8192*
	Fenoles		1.0000	0.8252*	0.8339*
	POX			1.0000	0.8924*
	PAL				1.0000

* Nivel de significancia $\alpha=0.05$. POX: Peroxidasa, PAL: Fenilalanina-amonio-liasa. ns: No significativo.
+ S/F: sin fungicida; ++ C/F: con fungicida.

Estos resultados concuerdan con Arora y Wagle (1985); Patil *et al.* (1985); Bashan (1986); Luthra *et al.* (1988); Velazhahan y Vidhyasekaran (1994) y Mucharromah *et al.* (1995).

5. CONCLUSIONES

- ◆ Hubo respuesta diferencial en la actividad enzimática de defensa entre genotipos.
- ◆ No se observó la relación inversa esperada en la concentración de fenoles respecto a la infección (a mayor presencia de fenoles se esperaba menor infección), pero sí se observó en la actividad de POX y PAL.
- ◆ Los fungicidas aplicados a la variedad susceptible (Alpha) indujeron mayor síntesis de fenoles en relación a los genotipos resistentes (60 y 12 % $\leq$, respectivamente).
- ◆ Hubo una variación en la correlación entre variables de acuerdo al grado de resistencia de los genotipos, siendo la susceptible la que tuvo menor correlación entre algunas de sus variables ($r < 0.7000$), que las resistentes.
- ◆ Los clones estudiados presentaron mayor significancia estadística en la correlación de respuestas por lo que su resistencia es el resultado de un mayor o mejor equilibrio entre estas variables.

6. LITERATURA CITADA

- Abad G. and Abad J. 1995. Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pearl melon in the Andes of South America. *In*: L. J. Dowley, E. Bannon, L. R. Cooke, T. Keane and E. O' Sullivan (eds). *Phytophthora infestans* 150. Boole Press Ltd., Ireland. pp. 36-49.
- Abad G., Abad J. and Ochoa C. 1995. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the Peruvian Andes as the centre of origin of *Phytophthora infestans*. *In*: L. J. Dowley, E. Bannon, L. R. Cooke, T. Keane and E. O' Sullivan (eds). *Phytophthora infestans* 150. Boole Press Ltd., Ireland. pp. 239-245
- Abbasi P. A., Graham M. Y. and Graham T. L.. 2001. Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 59:95-105.
- Agrios G. N. 2001. Fitopatología. Editorial UTEHA. Noriega Editores. 2ª Edición. México, D. F. pp. 98-117.
- Alia-Tejacal I., M. T. Martínez-Damián y M. R. Soto-Hernández. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H. E. Moore & Stearn) durante poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8:263-271.
- Andreu A., C. Oliva, S. Distel and G. Daleo. 2000. 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 Res.* 44:1-9.
- Angenault J. 1998. Diccionario enciclopédico de química. CECSA. México.

- Apostol I., P. F. Heinstein, and P.S. Low. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 90:109-116.
- Arora K. and D. S. Wagle. 1985. Interrelationship between peroxidase, polyphenol oxidase activities and phenolic content of wheat for resistance to loose smut. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 180:75-80.
- Arz C. M. and J. H. Grambow. 1995. Elicitor and Suppressor Effects on Phospholipase C in Isolated Plasma Membranes Correlate with Alterations in Phenylalanine Ammonia-lyase Activity of Wheat Leaves. *J. Plant Physiol.* 146:64-70.
- Bashan Y. 1986. Phenols in cotton seedlings resistant and susceptible to *Alternaria macrospora*. *Phytopathology* 116:11-17.
- Beckman C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? . *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 57:101-110.
- Bestwick C. S., I. R. Brown, M. Bennett and J. W. Mansfield. 1997. Peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *The Plant Cell* 9:209-221.
- Boller T. 1982. Ethylene-induced biochemical defenses against pathogens. *In: Wareing P. F. ed. Plant Growth Substances.* Academic Press. London. pp. 303-312.
- Bostock R. M., J. A. Kuc and R. A. Laine. 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpens in the potato. *Science* 212:67-69.

- Buonaurio R., G. D. Torre and P. Montalbini. 1987. Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phasioli*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 31:173-184.
- Cahill D. M. and E. W. B. Ward. 1989. Effects of metalaxyl on elicitor activity, stimulation and glyceollin production and growth of sensitive and tolerant isolates of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 35:97-112.
- Campbell M. M. and B. Ellis. 1992b. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. II. Cell wall-bound phenolics. *Phytochemistry* 31:737-742.
- Campbell M. M. and B. Ellis. 1992a. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. I. Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* 186:409-417.
- Chen Z., H. Silva and D. F. Klessig. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1886.
- Colon L. T. and D. J. Budding. 1988. Resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in ten wild *Solanum* species. *Euphytica* 1:77-86.
- Corne M. J., P. Pierre, J. G. M. De Wit and P. M. Francine G. 1992. Molecular aspects of the potato-*Phytophthora infestans* interaction. *Neth, J. Pl. path.* Vol. 98. Suplemento.
- Cvikrová, M., M. Hrubcová, M. Vágner, M. Ivana, and J. Eder. 2003. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. *Plant Pathol.* 52: 22-29.
- Darvill A. G. and P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:243-275.

- De Wit P. J. G. M. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:391-418.
- Dercks W. and L. Creasy. 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 34:203-213.
- Devadas S. K. and R. Raina. 2002. Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis hrr11* mutant. *Plant Physiol.* 128:1234-1244.
- Dixon R. A. and M. J. Harrison. 1991. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Genet.* 28:166-234.
- Dixon R. A. and C. J. Lamb. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:339-367.
- Dowley L. J. 1995. Research on *Phytophthora infestans* in Ireland: a short historical review. In: L. J. Dowley, E. Bannon, L.R. Cooke, T. Keane and E. O'Sullivan, (edits.). *Phytophthora infestans* 150. Boole Press Ltd., Ireland. pp. 12-29.
- Edwards K., C. L. Cramer, G. P. Bolwell, R. A. Dixon, W. Schuch and C. J. Lamb. 1985. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6731-6735.
- Enkerli J., U. Gisi, and E. Mössinger. 1993. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 43:161-171.

- Farmer E. E. and C. A. Ryan. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4:129-134.
- Favali M. A., G. G. Conti and M. Bassi. 1978. Modifications of the vascular bundle ultrastructure in the “resistant zone” around necrotic lesions induced by tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 13:247-251.
- Flier W. G., Grunwald N. J., Kroon P. N. M., Van den Bosh B. M., Garay S. E., Lozoya S. H., Bonants P. J. M. and Turkensteen, L. J. 2002. *Phytophthora infestans* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipendiculata* in the Toluca Valley of Central Mexico. *Mycol. Res.* 106:848-856.
- Flurkey W. H. and J. J. Jen. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. of Food Sci.* 43:1828-1831.
- Fritig B., J. Gosse, M. Legrand and L. Hirth. 1973. Changes in phenylalanine ammonia-lyase during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. *Virology* 55:371-379.
- Fritze-meier K. H., C. Cretin, E. Kombrink, F. Rohwer, J. Taylor, D. Scheel and K. Hahlbrock. 1987. Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent and avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 85:34-41.
- Gallegly M. E. and J. A. Galindo. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48:274-276.
- Gogoi R., D. V. Singh and K. D. Srivastava. 2001. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. *Plant Pathol.* 50:470-578.
- Goodman N. R., Z. Kiraly and K. R. Wood. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press. Columbia. U.S.A. 433 p.

- Goodwin S. B. 1996. Origin and Ecology of *Phytophthora infestans*. Rev. Méx. de Fitopatología 14:143-147.
- Gustine D. L., R. T. Sherwood, B. G. Moyer and F. L. Lukezic. 1991. Metabolites from *Pseudomonas corrugata* elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. Phytopathology 80:1427-1432.
- Hahn M. G., A. G. Darwill and P. Albersheim. 1981. Host pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin-accumulation in soybeans. Plant Physiol. 68:1161-1169.
- Hammond-Kosack K. E. and J. D. Jones. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell 8:1773-1781.
- Harborne J. B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In: J. B. Harborne (ed.). Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Academic Press. Great Britain. pp. 1-28.
- Henfling W. J. 1987. Late blight of potato (*Phytophthora infestans*). Technical information bulletin 4. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. 25 p.
- Jaek E., B. Dumas, P. Geoffroy, N. Favet, D. Inzé, M. Van Montagu, B. Fritig and M. Legrand. 1992. Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of O-methyltransferases mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. Mol. Plant Microbe Interact. 5:294-300.
- Jankiewicz L. S. y P. Sobiczewski. 2003. Las fitoalexinas y otras sustancias relacionadas con la resistencia de las plantas a los patógenos. In: L. S. Jankiewicz (ed.). Reguladores del Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Volumen I Propiedades y acción. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 427-464.

- Jaramillo S. V. I. A. y A. D. Rojas. 1997. Aspectos bioquímicos de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) al ataque del hongo *phytophthora infestans*. Revista Papa. Colombia. pp. 10-18.
- Keen N. T. 1981. Evaluation of phytoalexins. In: Staples R. C. Toenniessen G. H. eds. Plant Disease Control. Resistance and Susceptibility. Wiley-Interscience. New York. pp. 155-177.
- Keen N. T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. 24:447-463.
- Klessig D. F. and J. Malamy. 1994. The salicylic acid signal in plants. Plant. Mol. Biol. 26:1439-1448.
- Kuč J. 1982. Induced immunity to plant disease. BioScience 32:854-860.
- Lawton M. A. and C. J. Lamb. 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. Mol. Cell Biol. 7:335-341.
- Legrand M., B. Fritig and L. Hirth. 1976. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. Phytochemistry 15:1353-1359.
- Levine A., R. Tenhaken, R. Dixon, and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 79:583-593.
- Lewis N. G. and E. Yamamoto. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41:455-496.
- Linke C., C. Uwe, J. Wolfgang, B. Thomas, M. Andreas, D. Klaus and H. E. Neuhaus. 2002. Inhibition of the plastidic ATP/ADP transporter protein primes potato

- tubers for augmented elicitation of defense responses and enhances their resistance against *Erwinia carotovora*. Plant Physiol. 129:1607-1615.
- Lozoya-Saldaña H. y A. Hernández-Vilchis. 2001. Compuestos registrados y de la sección 18 para el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De By) en papa en Toluca, México. Agrociencia 35:451-458.
- Lozoya-Saldaña H., V. Sánchez-Lopéz V., R. Román-Vázquez y A. Hernández-Vilchis. 2002. Virosis en clones internacionales de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el valle de Toluca, México. Agrociencia 36:93-102.
- Lulai E. C. and D. L. Corsini. 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 53:209-222.
- Luthra Y. P., S. K. Gandhi, U. N. Joshi and S. K. Arora. 1988. Total phenols and their oxidative enzymes in sorghum leaves resistant and susceptible to *Ramulispora sorghicola* Harris. Acta Phytopathol. et Entomol. Hungarica 23:393-399.
- Lynn D. G. and M. Chang. 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol. 41:497-526.
- Lyon G. D. and P. Albersheim. 1982. Host - pathogen interactions XXI. Extraction of a heat-labile elicitor of phytoalexin accumulation from frozen soybean stems. Plant Physiol. 70:406-409.
- Manibhushanrao K., Z. Mohammed and N. Matsuyama. 1988. Phenol Metabolism and Plant Disease Resistance. Acta Phytopathol. et Entomol. Hungarica 23:103-114.
- Martínez-Téllez M. A. and M. T. Lafuente. 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase

- activities in flavedoof chilled fortune mandarin fruit. J. Plant Physiol. 150:674-678.
- Mona C. M. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105:467-472.
- Mozzetti C., L. Ferraris, G. Tamiatti, and A. Matta. 1995. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 46:95-107.
- Mucharromah, H. R. Burton and J. Kuć. 1995. The effect of sterols on phytoalexin, steroid glycoalkaloid, and sterol accumulation in potato tuber discs inoculated with *Phytophthora infestans* or treated with arachidonic acid. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 47:13-27.
- Orr J. D., R. Edwards and R. A. Dixon. 1993. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XIV. Changes in the levels of phenylpropanoid pathway Intermediates in relation to regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase in elicitor-treated cell-suspension cultures. Plant Physiol. 101:847-856.
- Parr A. J. and P. G. Bolwell. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying phenols content or profile. J. Sc. and Agric. 80:985-1012.
- Patil S. H., R. K. Hedge and K. H. Anahosur. 1985. Role of sugars and phenols in charcoal rot resistance of sorghum. Phytopathol. Z. 113:30-35.
- Pellegrini L., P. Geoffroy, B. Fritig and M. Legrand. 1993. Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tubacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. Plant Physiol. 103:509-517.

- Peng M. and J. Kuc. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.
- Piñol M. T., J. Palazón y R. M. Cúcido. 2000. Introducción al metabolismo secundario. *In: Azcón-Bieto, J. y M. Talón. (eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. MacGraw-Hill Interamericana y Ediciones Universidad de Barcelona. España. pp. 261-283.*
- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43:439-463.
- Robards K., P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang y W. Glover. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401-436.
- Robinson D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. *In: P. F. Fox. (ed.). Food enzymology. Vol. 1. Elsevier, London. pp. 399 – 426.*
- Robinson R. A. 1996. Retorno a la resistencia: Fitomejoramiento para depender menos de los plaguicidas. (Traducción por Romero R. F., 2000). IFIT. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 292 p.
- Rouxel T., A. Sarniguet and A. Kollmann. 1989. Accumulation of phytoalexin in *Brassica* spp. In relation to hypersensitive reaction to *Leptoshaeria maculans*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 34:507-517.
- Rubio O., V. Magallanes, C. Díaz, A. Rivera, H. López y T. Zavala. 2001. Zafiro y Malinche: nuevas variedades de papa mexicanas. *In: Fernández-Northcote E. N. (Editor). Memorias del Taller Internacional Complementando la resistencia al*

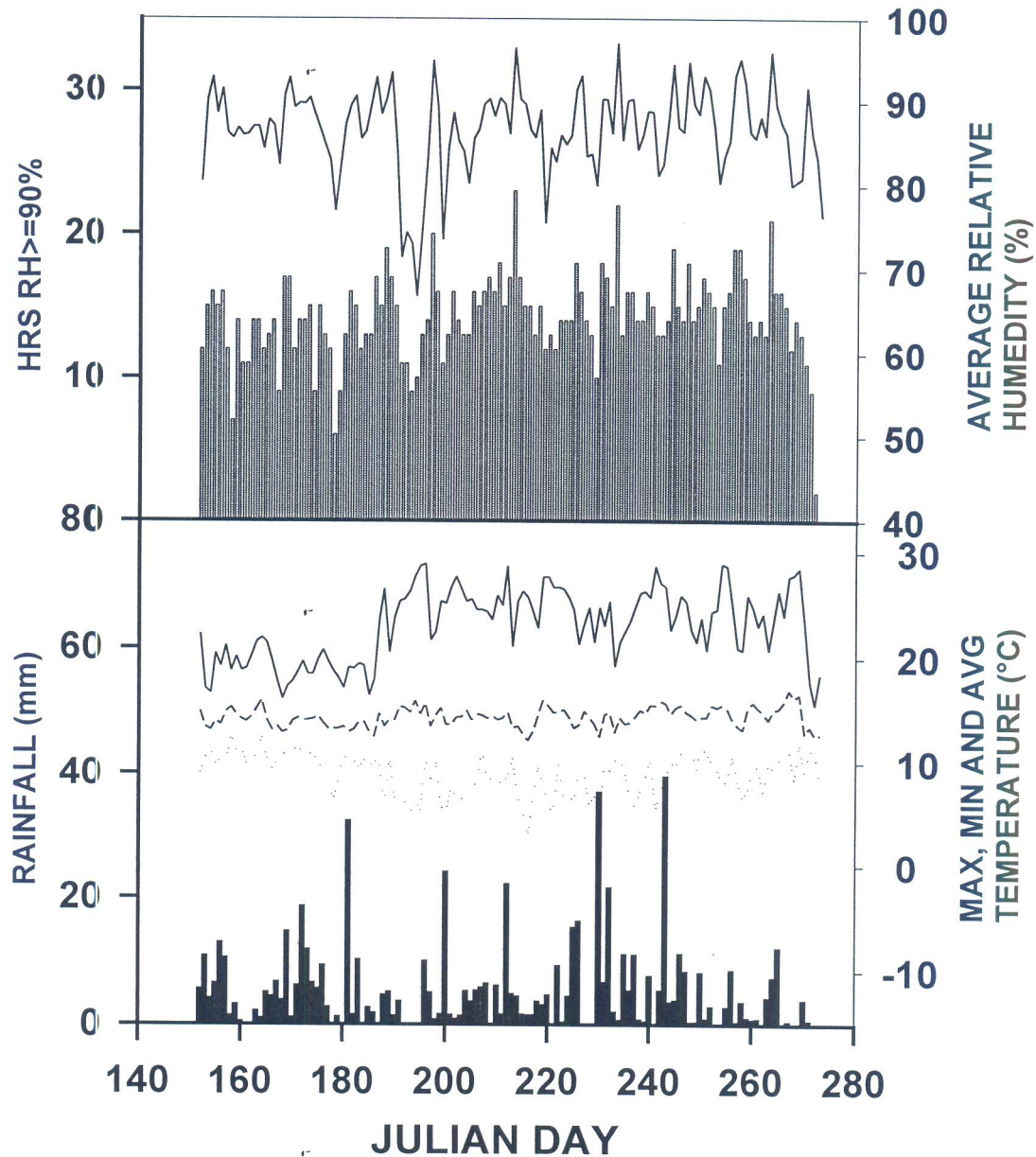
- tizón (*Phytophthora infestans*) en los Andes. Febrero 13-16, 2001, Cochabamba, Bolivia. p. 3.
- Ryals J., A. L. Kay, P. D. Terrence, F. Leslie, K. Helmut, N. Urs, U. Scott, V. Bernard, and W. Kris. 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4202-4205.
- Ryals J., S. Uknes. and E. Ward. 1994. Systemic Acquired Resistance. Plant Physiol. 104:1109-1112.
- Salisbury F. B. y C. W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Grupo editorial Iberoamericana. México, D. F. 759 p.
- Saniewski M. 1995. Methyl jasmonate in relation to ethylene production and other physiological processes in selected horticultural crops. Acta Horticulturae 394:85-98.
- Shiraishi, T., T. Yamada, R. L. Nicholson, and H. Kunoh. 1995. Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (race 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 46:153-162.
- Srivastava S. K. 1987. Peroxidase and polyphenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid. and their implication in disease resistance. J. Phytopathol. 120:249-254.
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Plant biochemistry. Dey, P.M., J. B. Harborne (eds). Academic Press. Great Britain. pp. 387-416.
- Sutherland M. W. 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 39:79-93.

- Trujillo, A., O. Navia, J. Gabriel, A. Gandarillas y E. N. Fernández-Northcote. 2001. Utilización de un activador de resistencia en estrategias de control químico del tizón de la papa (*Phytophthora infestans*) en un cultivar resistente. In: Fernández-Northcote E. N. (Editor). Memorias del Taller Internacional Complementando la resistencia al tizón (*Phytophthora infestans*) en los Andes. Febrero 13-16, 2001, Cochabamba, Bolivia. p. 5.
- Vámos-Vigiázó L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Critical Review of Food Science and Nutrition 15:49-127
- Vanderplank J. E. 1963. Plant Diseases; Epidemics and Control. Academic Press. New York, USA. 349 p.
- Van De Velde F., F. Rantwijk y R. A. Sheldon. 2001. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. Trends in Biotechnology 19:73-80.
- Velazhahan R. and P. Vidhyasekaran. 1994. Role of phenolic compounds, peroxidase and polyphenol oxidase in resistance of groundnut to rust. Acta Phytopathol. et Entomol. Hungarica. 29:23-29.
- Vera-Estrella R., E. Blumwald and V. J. Higgins. 1992 Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. Plant Physiol. 99: 1208-1215.
- Vidhyasekaran P. 1988. Physiology of disease resistance in plants. Vol. II CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. p. 128.
- Waterman P. G. and S. Mole. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- Way H. M., K. Kazan, N. Mitter, G. Kenneth, G. R. Birch and J. M. Manners. 2002. Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from

- Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 60:275-282.
- Yoder O. C. 1980. Toxins in pathogenesis. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 18:103-29.
- Zacheo G., T. Bleve-Zacheo, D. Pacoda, C. Orlando and R. D. Durbin. 1995. The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 46:491-507.

7. APÉNDICE

Apéndice 1. Precipitación diaria (mm); temperatura diaria máxima, mínima y media (°C); humedad relativa media diaria (%) y número de horas durante la cual la humedad relativa esta arriba del 90% (Hrs RH $\geq$ 90%) durante el periodo de crecimiento de la papa. Toluca, México, 2003. (Cortesía de Gaspar Romero M. y Claudia Belmar D.).



Apéndice 2. Comparaciones de medias para cada una de las variables estudiadas en las variedades y clones estudiados.

Cuadro 1. Comparaciones de medias para porcentaje de infección en las variedades y clones estudiados.

Material	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Alpha S/F	43.302 A	64.012 A	80.448 A	94.691 A	98.012 A	-
Alpha C/F	23.000 B	30.000 B	33.750 B	36.275 C	39.000 C	44.625 A
Zafiro S/F	10.000 C	18.500 C	37.500 B	52.500 B	67.500 B	78.750 B
Zafiro C/F	0.125 D	0.375 D	1.500 C	4.000 D	6.125 D	8.250 D
Clon A00531-21S/F	1.225 D	1.375 D	3.375 C	5.500 D	8.125 ED	21.750 C
Clon A00531-21C/F	0.400 D	0.700 D	1.150 C	1.750 D	2.250 ED	3.500 D
Clon A00502-3 S/F	0.100 D	0.225 D	0.475 C	0.875 D	1.500 ED	3.000 D
Clon A00502-3 C/F	0.125 D	0.275 D	0.450 C	0.700 D	1.050 E	1.250 D
Clon A00499-5 S/F	2.000 D	3.000 D	3.625 C	4.500 D	6.750 ED	9.750 DC
Clon A00499-5 C/F	0.225 D	0.450 D	0.775 C	1.250 D	1.750 ED	2.750 D

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey, $\alpha=0.05$. S/F: sin fungicida, C/F: con fungicida.

Cuadro 2. Comparaciones de medias para concentración de fenoles en las variedades y clones estudiados.

Material	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Alpha S/F	0.18701 B	0.49862 BC	0.53946 CB	0.50791 CD	0.46158 C	-
Alpha C/F	0.43498 A	0.58854 BA	0.72155 A	0.92451 A	0.91353 A	0.57754 A
Zafiro S/F	0.37235 A	0.51754 BC	0.61451 B	0.61135 CB	0.72859 BA	0.50378 A
Zafiro C/F	0.41433 A	0.61740 A	0.62430 B	0.74244 B	0.74469 BA	0.59577 A
Clon A00531-21S/F	0.36069 A	0.35906 E	0.38248 D	0.43042 D	0.48787 C	0.56678 A
Clon A00531-21C/F	0.36564 A	0.45929 DC	0.45966 CD	0.47234 CD	0.50121 C	0.59745 A
Clon A00502-3 S/F	0.34352 A	0.38767 DE	0.40821 D	0.43488 D	0.46637 C	0.61377 A
Clon A00502-3 C/F	0.35201 A	0.35391 E	0.37250 D	0.51820 CD	0.53671 BC	0.56078 A
Clon A00499-5 S/F	0.43604 A	0.43600 DCE	0.44630 D	0.51952 CD	0.60985 BC	0.61977 A
Clon A00499-5 C/F	0.43968 A	0.44801 DCE	0.45469 CD	0.60144 CB	0.65032 BC	0.67856 A

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey, $\alpha=0.05$. S/F: sin fungicida, C/F: con fungicida.

Cuadro 3. Comparaciones de medias para actividad de POX en las variedades y clones estudiados.

Material	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Alpha S/F	1907.2 BAC	4692.9 A	5176.8 A	4183.7 BA	3099.7 B	-
Alpha C/F	2212.2 BA	2648.8 CB	2887.8 C	4330.7 BA	3284.9 B	1405.5 E
Zafiro S/F	2834.9 A	4010.7 A	4596.3 BA	4846.4 A	5903.4 A	5285.0 BA
Zafiro C/F	2296.2 A	2869.4 B	3168.0 BC	3428.4 BC	2804.8 B	2368.0 ED
Clon A00531-21S/F	1759.8 BAC	1904.2 CD	2339.9 C	2528.4 DC	2788.6 B	3876.1 BDC
Clon A00531-21C/F	930.5 C	1113.1 D	1741.7 C	1926.6 D	2058.8 B	2661.9 EDC
Clon A00502-3 S/F	2012.4 BAC	2091.9 CB	2376.6 C	3469.4 BC	4264.1 BA	5907.6 A
Clon A00502-3 C/F	1187.0 BC	2269.9 CB	2307.1 C	3440.0 BC	4288.2 BA	5823.9 A
Clon A00499-5 S/F	2065.2 BA	2265.7 CB	2316.2 C	3505.6 BC	4003.8 BA	4558.2 BA
Clon A00499-5 C/F	1125.1 BC	2435.5 CB	3042.4 C	3282.9 BC	3503.9 BA	4331.9 BAC

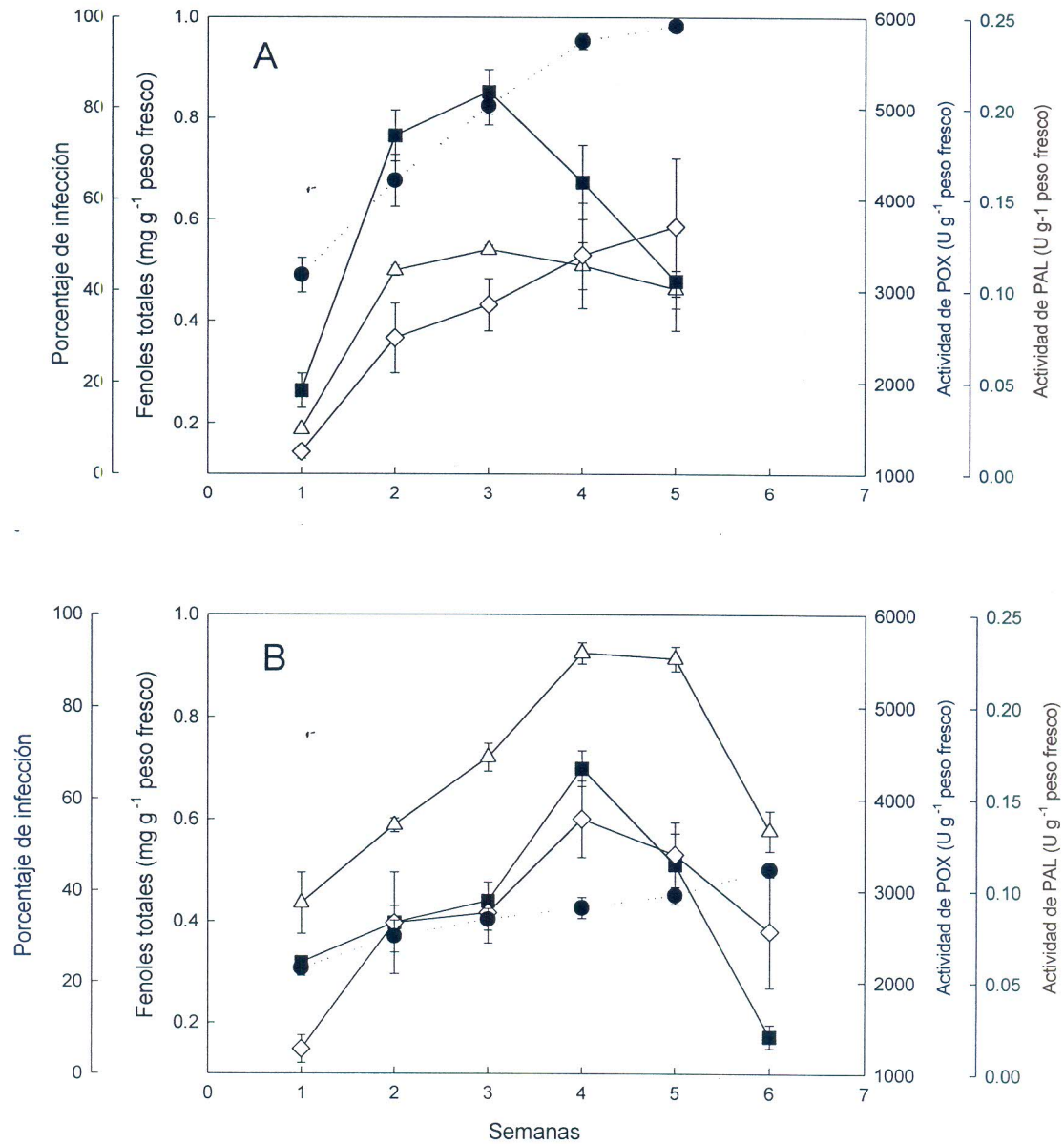
Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey, $\alpha=0.05$. S/F: sin fungicida, C/F: con fungicida.

Cuadro 4. Comparaciones de medias para actividad de PAL en las variedades y clones estudiados.

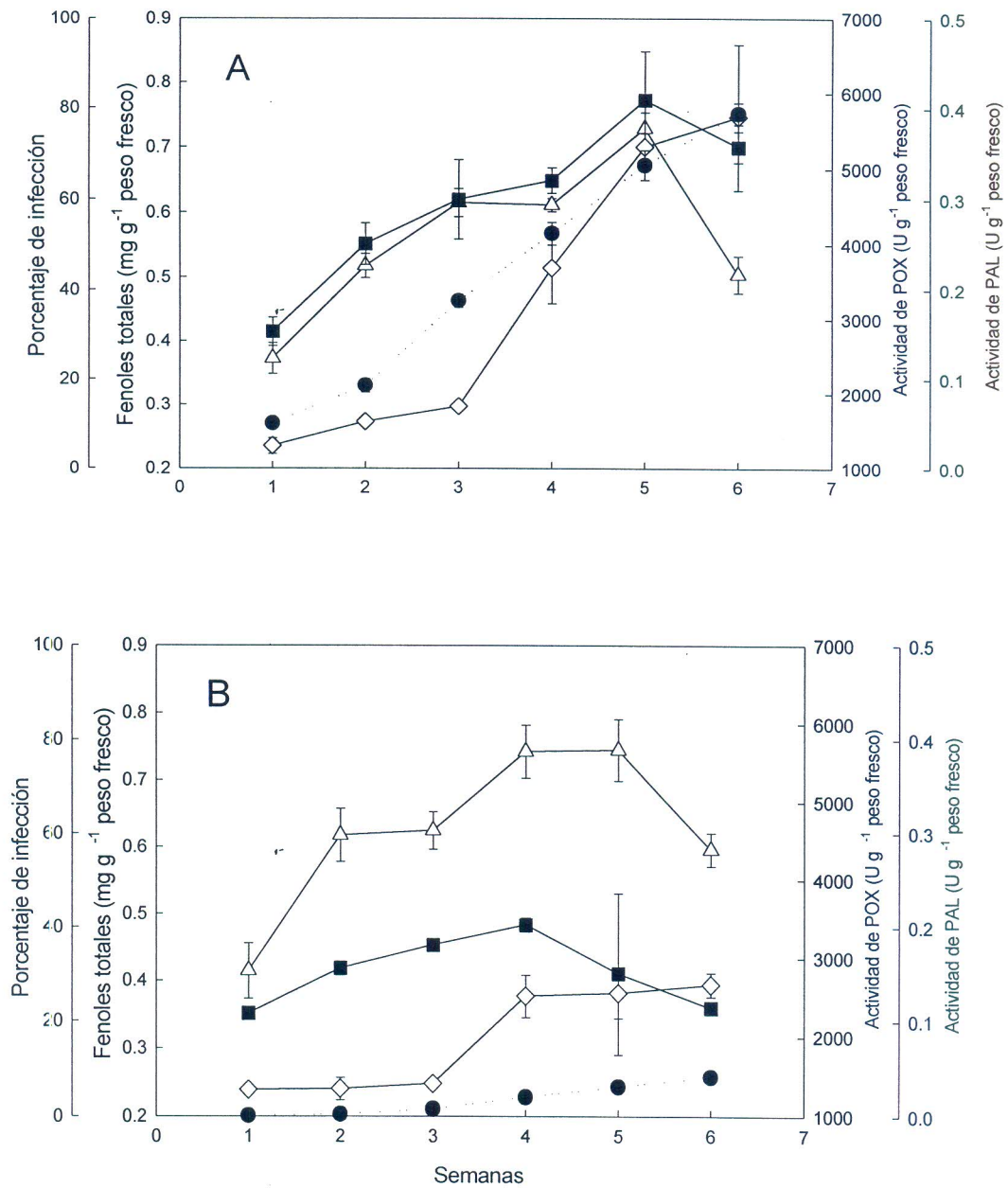
Material	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Alpha C/F	0.01188 A	0.07382 A	0.09205 A	0.11903 B	0.13460 BC	-
Alpha C/F	0.01333 A	0.08222 A	0.08788 A	0.13903 BA	0.11969 BC	0.07778 B
Zafiro S/F	0.02743 A	0.05170 A	0.06896 A	0.22424 BA	0.35728 A	0.39014 A
Zafiro C/F	0.02743 A	0.02861 A	0.03385 A	0.12632 B	0.12946 BC	0.13847 D
Clon1 S/F	0.02694 A	0.05128 A	0.07035 A	0.29997 BA	0.34413 A	0.36257 C
Clon1 C/F	0.02990 A	0.04583 A	0.06771 A	0.30069 BA	0.29721 BA	0.30451 D
Clon2 S/F	0.01771 A	0.01830 A	0.06660 A	0.19628 BA	0.20196 BAC	0.21441 D
Clon2 C/F	0.01378 A	0.03514 A	0.07604 A	0.35160 A	0.35076 A	0.35354 D
Clon3 S/F	0.03896 A	0.03819 A	0.09722 A	0.13969 BA	0.14313 BC	0.14597 DC
Clon3 C/F	0.03340 A	0.03632 A	0.08684 A	0.09872 B	0.10196 C	0.10587 D

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey, $\alpha=0.05$. S/F: sin fungicida, C/F: con fungicida.

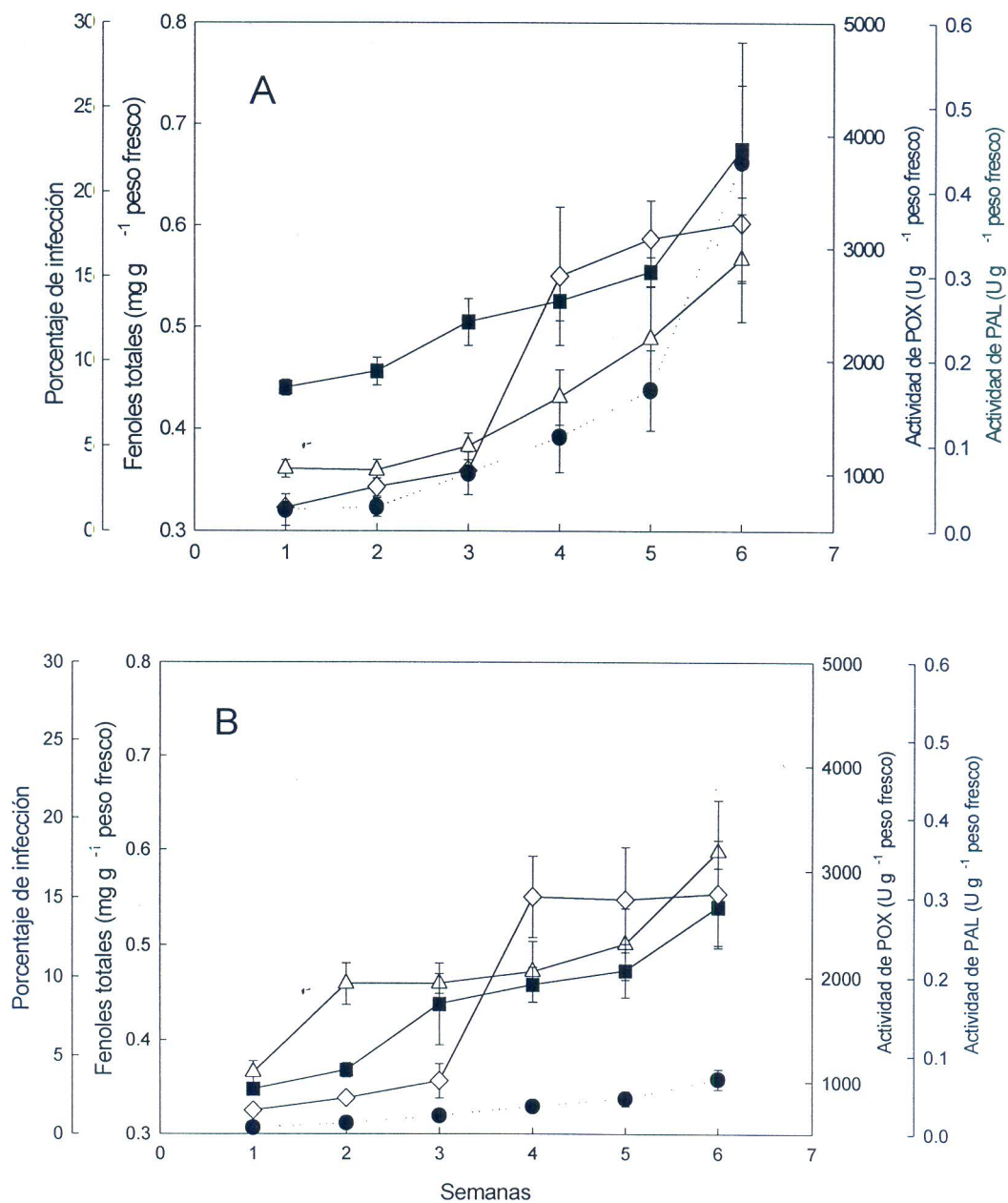
Apéndice 3a. Fenoles totales ($\triangle$), Actividad de POX ($\blacksquare$), Actividad de PAL ($\diamond$) y Porcentaje de infección ($\bullet$) para Alfa sin (A) y con (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.



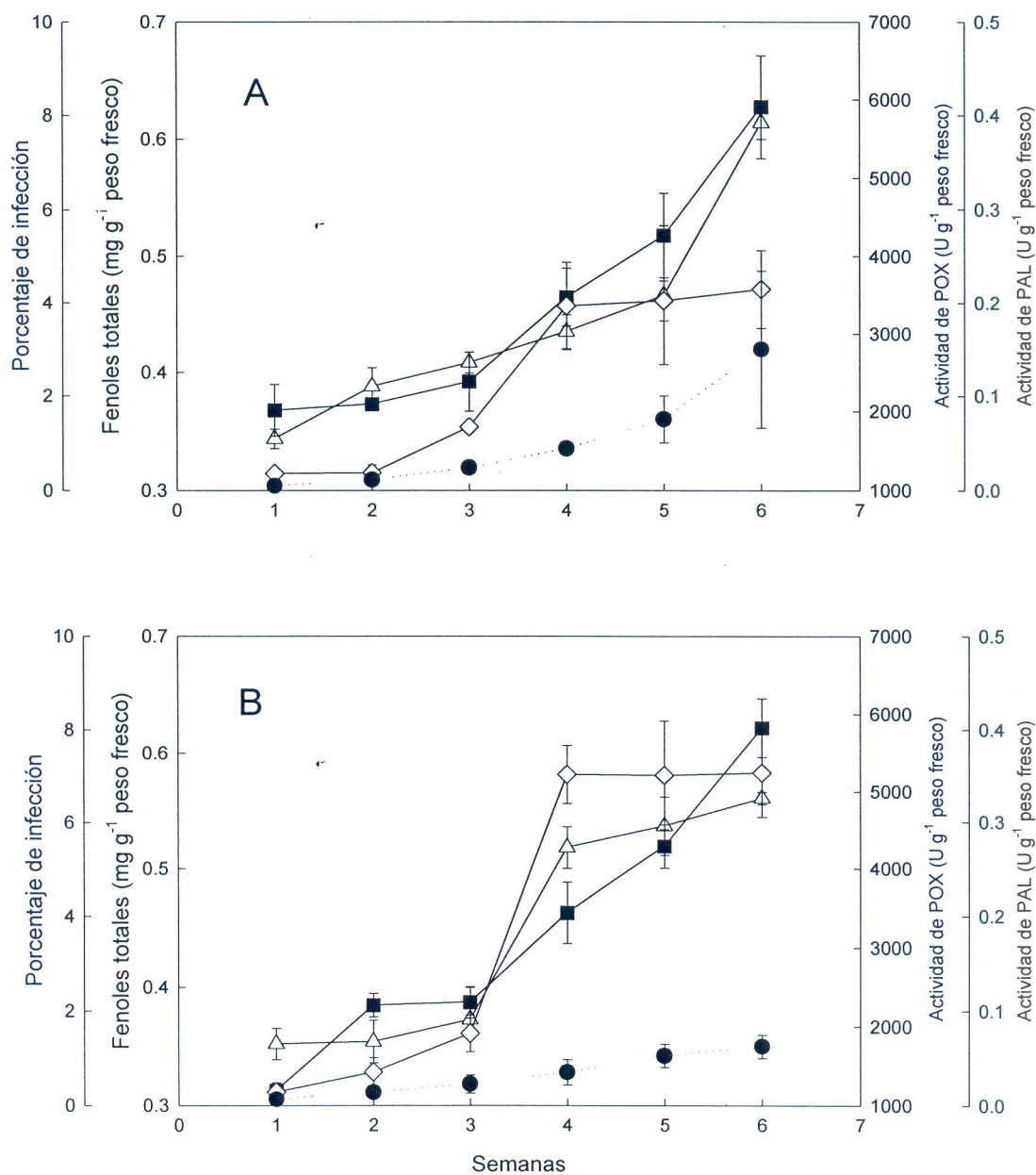
Apéndice 3b. Fenoles totales ($\triangle$), Actividad de POX ($\blacksquare$); Actividad de PAL ($\diamond$) y Porcentaje de infección ($\bullet$) para Zafiro sin (A) y con (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.



Apéndice 3c. Fenoles totales ($\triangle$), Actividad de POX ($\blacksquare$); Actividad de PAL ($\diamond$) y Porcentaje de infección ($\bullet$) para el clon A00531-21 sin (A) y con (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.



Apéndice 3d. Fenoles totales ($\triangle$), Actividad de POX ($\blacksquare$); Actividad de PAL ($\diamond$) y Porcentaje de infección ($\bullet$) para el clon A00502-3 sin (A) y con (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.



Apéndice 3e. Fenoles totales ($\triangle$), Actividad de POX ($\blacksquare$); Actividad de PAL ($\diamond$) y Porcentaje de infección ($\bullet$) para el clon A00499-5 sin (A) y con (B) fungicida. Cada punto representa la media de cuatro observaciones $\pm$ error estándar.

