



Universidad Autónoma Chapingo

Departamento de Parasitología Agrícola

Maestría en Protección Vegetal

Algunas Reacciones De Defensa En Diferenciales De
Solanum spp. Para Razas De *Phytophthora infestans* (Mont.)
De Bary.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

NORIS DALIA CALDERON MARCIAL

Chapingo, Estado de México, Junio de 2008



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

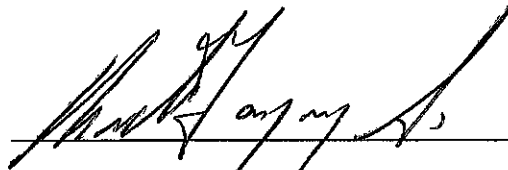


Algunas Reacciones De Defensa En Diferenciales De *Solanum* spp. Para Razas De *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.

Tesis realizada por Noris Dalia Calderon Marcial, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

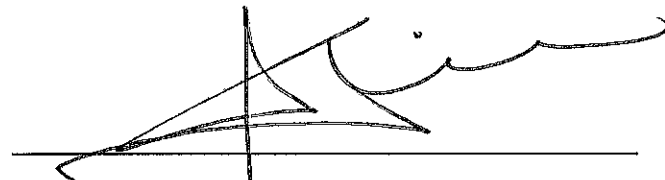
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Héctor Lozoya Saldaña', written over a horizontal line.

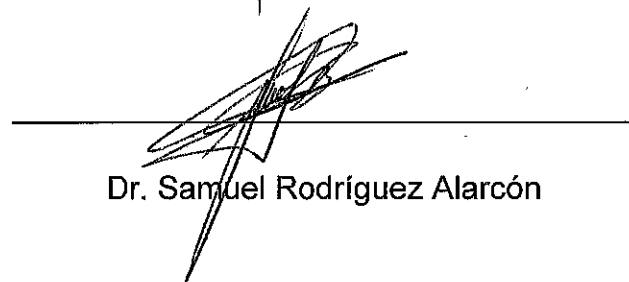
Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Víctor Manuel Pinto', written over a horizontal line.

Dr. Víctor Manuel Pinto

ASESOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Samuel Rodríguez Alarcón', written over a horizontal line.

Dr. Samuel Rodríguez Alarcón

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme disfrutar de la vida, de mi familia y lograr una meta más.

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

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Departamento de Parasitología Agrícola. A todos los profesores que me impartieron materias, por brindarme el apoyo y conocimiento durante mi estancia. A PICTIPAPA en México por el apoyo brindado.

Al Dr. Héctor Saldaña por su dedicación y aportaciones en el presente trabajo. Al Dr. Víctor Manuel Pinto y Dr. Samuel Rodríguez Alarcón por su atención que me brindaron.

Al personal de laboratorio de Usos Múltiples de Fitotecnia, Cecilio y Tacho por su apoyo y paciencia para lograr obtener el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Protección Vegetal: Guillermina, Aida, Maricela, Evaristo, Oscar y Exaú por la ayuda que recibí de ellos dentro y fuera del aula de clases.

DEDICATORIA

A mis padres:

Ricardo Calderon Cruz y Alfonsina Marcial Rodríguez, por regalarme la vida, brindarme amor y apoyo todos los días de mi vida.

A mis hermanos:

Ricardo y Lizbeth, por su amor, cariño, paciencia, respeto y todos aquellos momentos de felicidad, tristeza y enojo que hemos compartido.

A mis otros hermanos:

Alonso, Alexis, Vanesa, Karen y Roberto Carlos.

A todas las mujeres de la familia Rodríguez en especial a Enedina y Juanita por ese ejemplo de fortaleza y lucha.

A mis abuelos:

Fidela Rodríguez, Amalia Cruz y José Calderón, por consentirme y quererme.

A la amistad sincera, incondicional, divertida y valiente:

Psc. Gabriela Olguín Chávez, por todas aquellas aventuras y por ser ya mi hermana.

Biol. Aida Juárez Cruz, por su apoyo y consejos brindados.

A la familia que quiero mucho:

Eduardo Jiménez e Irene Mesinas y sus hijos Adriana, Ulises y familia. Por el apoyo, cariño y solidaridad que me han demostrado día a día.

A mis amigos:

Abel y Néstor por demostrarme su cariño, amistad y mucha alegría.

A mis amores:

Gerardo Fernández Fernández y nuestro bebé que crece en mi vientre

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de la presente tesis nació en el Distrito Federal de la Ciudad México, en la cual realizó sus estudios de primaria en la escuela Manuel Rivera Cambas, Secundaria Federico Froebel No.98 y medio superior en el Colegio de Bachilleres No. 6. Ingresa a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa en 1999, de donde egresa como Licenciada en Biología. En Agosto del 2005 ingresa a la Maestría en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo y egresa en Junio del 2008.

*Haz lo necesario para lograr tu más ardiente deseo, y
acabarás lográndolo.*

Ludwig van Beethoven

CONTENIDO

RELACION DE FIGURAS	viii
RELACION DE CUADROS	ix
RESUMEN, ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Tizón tardío de la papa: <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary.	5
2.1.1. Origen	5
2.1.2. Características morfológicas.	5
2.1.3. Reproducción	6
2.1.3.1. Fase asexual	6
2.1.3.2. Fase sexual.	7
2.1.4. Síntomas	7
2.1.5. Epidemiología	8
2.1.6. Ciclo de vida	9
2.2. Razas fisiológicas	11
2.2.1. Origen	11
2.3. Resistencia genética	14
2.3.1. Resistencia vertical	14
2.3.2. Resistencia horizontal	15
2.3.3. Modelo gen por gen.	16
2.4. Reconocimiento del patógeno	19
2.4.1. Elicitor	19
2.5. Mecanismo de defensa a nivel membrana celular	20
2.5.1. Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS)	21
2.5.2. Superoxido Dismutasa (1.15.1.1; SOD)	23
2.5.3. Peroxidasa (EC 1.11.1.7; POX)	23
2.6. Mecanismos bioquímicos de defensa	24
2.6.1. Respuesta Hipersensitiva (RH)	25
2.6.2. Componentes fenólicos	27
2.6.3. Fitoalexinas	28
2.6.4. Fenilalanina Amonio-Liasa (EC 4.3.1.5; PAL)	29

2.7. Activación de la reacción de defensa en plantas.	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Ubicación del experimento	33
3.2. Material biológico	33
3.3. Fase de campo	34
3.4. Fase de laboratorio	35
3.4.1. Determinación de fenoles	35
3.4.2. Determinación de actividad enzimática PAL.	36
3.5.3. Determinación de actividad enzimática POX	37
3.4.4. Determinación de actividad enzimática de SOD.	38
3.5. Análisis de datos	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Incidencia de razas fisiológicas	40
4.2. Fenoles totales	42
4.3. Actividad enzimática PAL	43
4.4. Actividad enzimática POX	45
4.5. Actividad enzimática SOD	46
4.6. Análisis de correlación	48
5. CONCLUSIONES	55
6. BIBLIOGRAFIA	56
7. APENDICE	67

RELACION DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones de defensa de la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1996)	32
Figura 2. Secuencia de aparición de las razas del tizón en función de las plantas diferenciales de <i>Solanum</i> spp.	41
Figura 3. Cuantificación de Fenoles Totales en plantas diferenciales de <i>Solanum</i> spp	43
Figura 4. Actividad PAL en plantas diferenciales.	45
Figura 5. Actividad POX en plantas diferenciales.	46
Figura 6. Actividad SOD en plantas diferenciales.	48

RELACION DE CUADROS

Cuadro 1. Relación entre las plantas diferenciales de papa y sus respectivos genes de susceptibilidad con respecto a las razas de <i>Phytophthora infestans</i> de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura (Black et al., 1953).	13
Cuadro 2. Representación cuadrática de interacción de gen hospedero-patógeno.	17
Cuadro 3. Representación cuadrática de dos genes de resistencia hospedero-patógeno.	18
Cuadro 4. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-9.	50
Cuadro 5. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-10.	51
Cuadro 6. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-1,2,4.	52
Cuadro 7. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-1,3,4.	53
Cuadro 8. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-5.	54

**Algunas Reacciones De Defensa En
Diferenciales De *Solanum* spp. Para
Razas De *Phytophthora infestans* (Mont.)
De Bary.**

**Noris Dalia Calderon Marcial¹, Héctor
Lozoya Saldaña²**

RESUMEN

Se planteó la presente investigación para identificar y describir cronológicamente la llegada de las razas patogénicas de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary en el Valle de Toluca, México. De igual manera también se planteó identificar la presencia y/o acción de metabolitos de defensa de las plantas diferenciales para dichas razas como respuesta al ataque del oomycete. Todas las razas fisiológicas descritas por Black (1953) llegaron casi simultáneamente (excepto R 2-3-4), pues las diferenciales presentaron la infección a la par entre ellas, con gran actividad de la fenil-alanina-amonio-liasa (PAL), la peroxidasa (POX) y la superóxido dismutasa (SOD) así como una alta concentración de fenoles totales en las primeras etapas de establecimiento del patógeno. Las correlaciones con una $P = \alpha \leq 0.05$ mostraron relación en la presencia y acción entre estas enzimas y entre estas con el nivel de infección. Se concluye que los mecanismos de defensa no fueron específicas ni monogénicos, pues las plantas reaccionaron de igual manera para los diversos metabolitos en estudio (varios genes involucrados), independientemente de la raza específica de *P. infestans* que las infecta.

Palabras clave: PAL, POX, SOD, *Solanum* spp, *P. infestans*.

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

² Director de tesis. Profesor Investigador. Universidad Autónoma Chapingo

**Some Defense Reactions in
Differentials De *Solanum* spp. For
Races *Phytophthora infestans* (Mont.) De
Bary.**

**Noris Dalia Calderon Marcial¹, Héctor
Lozoya Saldaña²**

ABSTRACT

The purpose of this research was to identify and chronologically describe the arrival of the pathogenic races of *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary in the Toluca Valley, Mexico, as well as to identify the presence and/or action of defense metabolites of the differential plants for such races as a response to the attack of the oomycete. All the physiological races described by Black (1953) arrived almost simultaneously (except R 2-3-4). The differentials showed infection at the same time among them, with a high activity of phenyl-alanine-ammonio-lyase (PAL), peroxidase (POX), and superoxide-dismutase (SOD), as well as a high concentration of total phenols in the early stages of the onset of the pathogen. Correlations ($P \leq \alpha = 0.05$) showed a relationship in the presence of and an action among these enzymes and between them and the infection rate. It is concluded that the defense mechanisms were neither specific nor monogenic because the plants reacted in the same way to the several metabolites under study, regardless of the specific race of *P. infestans* that infected them.

Key words: PAL, POX, SOD, *Solanum* spp, *P. infestans*.

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

² Thesis director. Research Professor. Autonomous University Chapingo

1. INTRODUCCIÓN

El tizón tardío de la papa continúa siendo uno de las enfermedades más importantes de todos los tiempos. Esta enfermedad es causada por el oomicete *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, presentando como centro de origen las tierras altas de México tanto de la diversidad genética del patógeno como del germoplasma relacionado con tubérculos de *Solanum* spp (Roussell *et al.*, 1999). Dando como resultado un patosistema *Phytophthora infestans*-Solanácea.

El desarrollo de la enfermedad del tizón tardío depende de varios procesos que se han estudiado por separado: uno de ellos es la agresividad del patógeno y el otro es la capacidad de respuesta del hospedero, encontrando que las esporas de todas las razas del hongo germinan con igual eficiencia en las variedades resistentes y susceptibles con frecuencias equiparables (Gees y Hohl, 1988).

Cuando un patógeno potencial intenta infectar a una planta, la comunicación bioquímica y molecular toma lugar conduciendo a la inducción del mecanismo de defensa en la planta. En el caso de una defensa eficiente los síntomas visibles estarán restringiendo al patógeno provocando que este no se multiplique (interacción incompatible); cuando la defensa es ineficiente la planta llega a ser rápidamente infectada (interacción compatible) (Desender *et al.*, 2007).

Durante la interacción planta-patógeno el reconocimiento de un patógeno potencial genera una Reacción Hipersensitiva (RH) provocando la activación de la muerte celular

programada en el sitio de ataque para interrumpir la propagación del patógeno (Radwan *et al.*, 2005).

Varios procesos característicos de la RH incluyen inicialmente la activación de componentes preexistentes más que los cambios en la expresión de genes. Uno de estos procesos es la gran liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Camarena, 2006), las cuales inducen la peroxidación de lípidos así como la síntesis de fenoles, fitoalexinas y la lignificación (Vidhyasekaran, 1997).

En la producción de fitoalexinas (metabolitos secundarios) representan un impacto significativo en la resistencia a la enfermedad de la planta (Pedras *et al.*, 2003). Otros compuestos que forman parte de estos metabolitos son los fenoles, que llegan a presentar un incremento en su biosíntesis, explicada por la expresión de genes de enzimas biosintéticas tales como la Fenilalanina Amonio-Liasa (PAL) (Azcon y Talon, 1993).

Los genes R para la resistencia al tizón tardío fueron descubiertos en dos especies endémicas de *Solanum* (*S. demissum* y *S. estoloniferum*). De las cuales se obtuvieron 11 genes (denominados R1 a R11) aunque no representan verdaderamente más que una pequeña parte de la variabilidad disponible (Grünwald y Flier, 2005).

A principios de los 1950's, hubo dos contribuciones, casi simultáneamente, que ampliaron el panorama sobre la existencia de las razas patogénicas de *P. infestans*:

- a) Cuando se observó el ataque del patógeno sobre variedades de papa norteamericanas, aparentemente resistentes en E.U.A., pero susceptibles en el

Valle de Toluca, se pensó en la presencia de razas diferentes en ambas regiones (Mills y Niederhauser, 1953.)

- b) Black *et al* (1953) y colaboradores propusieron una clasificación de plantas diferenciales de papa, como método de nomenclatura de las razas patogénicas de *P. infestans*, con genes específicos que rompen la inmunidad de dichas plantas, derivadas de *S. demissum*.

La presente investigación se planteó considerando que, a pesar de la gran variabilidad de *P. infestans* en el Valle de Toluca (Grünwald *et al.*, 2001), no se han estudiado las reacciones de la plantas diferenciales antes mencionadas, por Black (1953).

1.1. Objetivos

- ❖ Identificar y describir cronológicamente la llegada de las razas patogénicas de *P. infestans* al Valle de Toluca, Edo de México.
- ❖ Identificar la presencia y/o acción de metabolitos de defensa de las plantas diferenciales como respuesta al ataque de *P. infestans*.

1.2. Hipótesis

- ❖ Tomando en cuenta que el Valle de México es el centro de diversificación de *P. infestans*, se presentan todas las razas del patógeno a lo largo del ciclo del cultivo de papa.
- ❖ La acción de los metabolitos ante la respuesta de ataque de *P. infestas* será reflejado como síntoma macroscópico en forma de necrosis.
- ❖ Las enzimas PAL, POX y SOD se detonan cuando el patógeno ataca al hospedante, y se presentará actividad en función del grado de enfermedad de la planta.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

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

2.1.1. Origen

El tizón tardío causado por *P. infestans* es considerada como una de las más serias enfermedades de la papa. Se recuerdan como catastróficas las epifitias ocurridas en Gran Bretaña e Irlanda entre 1845 y 1850, por producir una aguda escasez de papa, que había logrado ser la base de la alimentación en esos pueblos. Además de los países citados, la enfermedad causó estragos en los cultivos de Europa y también de América del Norte (Calderoni, 1978).

Muchas evidencias muestran que en tierras altas de México, incluyendo el Valle de Toluca, se presenta el centro de diversidad de *P. infestans*, organismo causal del tizón tardío de la papa. La diversidad genética por virulencia, alozimas y restricción de largos fragmentos loci de polimorfismo son muy altos en el centro de México y los dos tipos de compatibilidad de apareamiento (A1 y A2) pueden encontrarse en una proporción 1:1 (Grünwald *et al.*, 2001).

2.1.2. Características morfológicas.

Micelio liso, poco ramificado, de 4.2 a 13.5 μm de diámetro, y en promedio de 9.2 μm ; esporangióforos: ramificados en simpodio compuesto, con hinchamientos en las ramas donde nacen los esporangios, de crecimiento indefinido; esporangios ovales a elípticos, alimonados, con papila incospicua, deciduos de 12 a 38 x 12 a 23 μm , promedio de 29 x

19 μm . Gamentagios: el oogonio es liso, globoso y activo, de 38 a 50 μm , promedio de 40 μm ; el anteridio es anfigio y pasivo; oosporas lisas, de paredes gruesas, esféricas, apleróticas de 25 a 35 μm de diámetro, con promedio de 30 μ (Romero, 1993).

2.1.3. Reproducción

P. infestans es un oomiceto que se reproduce asexual y sexualmente, presenta usualmente filamentos y estructuras somáticas ramificadas conocidas como hifas. También exhibe esporas sexuales y asexuales: oosporas, zooporangios y zoosporas respectivamente (Manfrim, 2002).

2.1.3.1. Fase asexual

La germinación del esporangio, se da por formación de tubo germinativo que eventualmente crece para formar micelio (germinación directa) o por diferenciación del citoplasma dentro del esporangio. Las zoosporas son liberadas a través de un poro de salida (germinación indirecta). La germinación directa depende de la temperatura y nutrición. Las temperaturas por arriba del óptimo generan crecimiento de micelio que favorece el desarrollo del tubo germinativo por esporangio. La temperatura óptima para desarrollo de tubo germinativo por esporangio de *P. infestans* es 24°C, mientras la diferenciación de zoosporas ocurre a 12°C. La diferenciación de esporangio y la liberación de zoosporas es en presencia de agua libre, y temperaturas por debajo del óptimo favorecen el crecimiento del hongo (Ribeiro, 1983).

2.1.3.2. Fase sexual.

Spielman *et al.* (1991) mencionan que la hibridación se lleva a cabo entre talos de tipos de apareamiento opuesto (A1 y A2), de un talo proviene el anteridio, del otro el oogonio y la recombinación genética ocurre con el cruce de progenies.

Cuando los tipos de compatibilidad crecen uno cerca del otro, la hifa femenina crece en dirección del anteridio joven y forma un oogonio, el cual después de ser fecundado por el anteridio se desarrolla en una oospora dura y de pared gruesa. Las oosporas germinan por medio de un tubo germinal, el cual produce un esporangio, aunque algunas veces forma directamente un micelio (Agrios, 1996).

De acuerdo a algunos estudios la hormona $\alpha 1$, producida por talos de apareamiento A1 induce reproducción con talos A2. Las diferencias cuantitativas que se han encontrado en interacciones de diferentes talos muestran que A1 generalmente produce más esporas que A2 (Elliott, 1983).

2.1.4. Síntomas

Frecuentemente la enfermedad aparece al final de la estación de crecimiento después de la floración, sin embargo en el Valle de Toluca los síntomas pueden observarse pocas semanas después de la siembra (Platt, 1992). Los síntomas iniciales típicos son unas manchas pequeñas de color verde claro y verde oscuro de forma irregular. Bajo condiciones favorables del medio ambiente, las lesiones progresan convirtiéndose en lesiones necróticas grandes de color castaño a negro purpúreo, que pueden causar la

muerte de los foliolos y diseminarse por los peciolos hacia el tallo, matando eventualmente a la planta integra. Bajo condiciones de humedad se forma un mildiu vellosito constituido por esporangios y esporangióforos en el borde de las lesiones especialmente en la cara inferior de las hojas (Hooker, 1980).

En el tubérculo se puede observar una alteración de color de la corteza que, se torna ligeramente castaño a rosado y a veces con áreas hundidas. El parénquima amiláceo adquiere un color castaño claro, si la pudrición es seca el tubérculo se mantiene entero, sin descomponerse, pero cuando se producen infecciones secundarias con bacterias u hongos, el tubérculo toma una consistencia blanda, con evidentes pudriciones cremosas (Calderoni, 1978).

2.1.5. Epidemiología

La infección en campo es favorecida por bajas temperaturas y alta humedad (Hooker, 1980). El oomiceto produce abundantes esporangios bajo condiciones de alta humedad. Si la temperatura es arriba de 13°C y la humedad es por debajo del 100%, estas esporas germinaran directamente (formación de tubo germinativo), pero si la temperatura es de 13°C y 100% de humedad relativa cada esporangio producirá 8-12 zoosporas (Rich, 1983).

Las zoosporas producen tubo germinativo y apresorio en presencia de agua libre, no resisten la falta de agua ya que mueren rápidamente por desecación (Hooker, 1980). Estas estructuras son diseminadas al salpicar las gotas de lluvia y son las responsables

del rápido desarrollo de la enfermedad en el cultivo, el cual llega a ser infectado inicialmente por germinación de tubo germinativo (Rich, 1983).

Los esporangios y las zoosporas germinan rápidamente cuando la temperatura asciende arriba de 13°C, especialmente en el rango de 16°-24°C. Las condiciones ideales para la epifitía son temperaturas nocturnas cercanas a los 12°C acompañadas por fuertes lluvias y rocío, seguido por temperaturas diurnas de 16°-24°C acompañadas por alta humedad producto de la lluvia y neblina (Rich, 1983).

2.1.6. Ciclo de vida

Han sido descubiertas tres formas de conservación invernal en *P. infestans*: supervivencia en el suelo (como saprofita u oosporas), conservación en los tubérculos infectados que quedan en el suelo o en las proximidades del campo y conservación en los tubérculos utilizados para siembra (Roussell *et al.*, 1999).

Cuando el oomiceto inverna en forma de micelio en los tubérculos de papa infectados, este micelio se propaga en los tejidos y por último llega a unos cuantos de los retoños que se formaron a partir de tubérculos infectados que se utilizan como semilla, así como a las plantas voluntarias desarrolladas a partir de tubérculos enfermos abandonados en campo. También puede llegar a los brotes que se han formado por las papas infectadas que fueron depositadas en los basureros o montones de desechos. El micelio se propaga hacia el tallo de las plantas con mayor rapidez a nivel de la región cortical, dando como resultado la decoloración y colapso de las células de esa zona. Mas tarde, el micelio se

desarrolla entre las células medulares del tallo, pero rara vez se le encuentra en sistema vascular. El micelio crece a través del tallo y llega a la superficie del suelo. Cuando el micelio alcanza las partes aéreas de las plantas produce esporangióforos que emergen a través de los estomas, hojas y del tallo para proyectarse al aire. Los esporangios que se forman sobre los esporangióforos se desprenden y son diseminados por la lluvia o bien son llevados por las corrientes de aire cuando han llegado a la madurez. Al depositarse sobre las hojas o tallos húmedos de las plantas de papa, los esporangios germinan y producen nuevas infecciones. El tubo penetra la cutícula de la hoja o entra a través del estoma y forma un micelio que crece profusamente entre las células y el cual envía largos haustorios enrollados hacia el interior de ellas. Las células en las que el micelio se nutre tarde o temprano mueren y conforme empiezan a degradarse, el micelio se propaga en la periferie en los tejidos carnosos de las hojas. Al cabo de unos días después de haberse producido la infección, emergen nuevos esporangióforos a través de estomas y hojas para producir numerosos esporangios que son diseminados por el viento e infectan a otras plantas. En un clima favorable, el periodo comprendido entre la aparición de la infección y la formación de los esporangios puede durar tan solo cuatro días y, como consecuencia, pueden producirse en una sola estación de crecimiento nuevas infecciones y numerosas generaciones asexuales del oomiceto. Conforme avanza la enfermedad, las lesiones previas continúan extendiéndose y aparecen otras, dando como resultado la muerte prematura del follaje de las plantas y una disminución proporcional en la producción de papa (Agrios, 1996).

La segunda fase de la enfermedad, o sea la infección de tubérculos, se produce en el terreno de cultivo durante tiempo húmedo, cuando los esporangios son arrastrados hacia el suelo. Los tubérculos de papa que se localizan cerca de la superficie del suelo son atacados por las zoosporas que han sido liberadas y que germinan, y penetran en ellos a través de heridas o lenticelas. En el tubérculo, el micelio se desarrolla principalmente entre las células y envía sus largos haustorios en forma de hoz hacia el interior de ellas. Los tubérculos rara vez son infectados por el micelio que crece hacia la parte inferior del tallo de una planta progenitora enferma. Sin embargo, si durante la cosecha los tubérculos son contaminados por esporangios todavía presentes en el suelo o bien si esos tubérculos son expuestos en tanto el hongo se encuentre esporulando en el follaje parcialmente enfermo de algunas plantas, es muy probable que produzca otra infección que en principio no se hizo evidente, pero la cual mas tarde se desarrolla durante el almacenamientos de los tubérculos. La mayoría de los tubérculos que han sido infectados se pudren en la tierra o bien cuando son almacenados (Agrios, 1996).

2.2. Razas fisiológicas

2.2.1. Origen

Una de las primeras noticias de la presencia de razas fisiológicas en México fue dada por Mills y Niederhauser (1953) quienes sembraron variedades consideradas inmunes en los Estados Unidos y viendo que estas eran severamente atacadas, determinaron que en

México hay mayor número de razas fisiológicas que en aquel país, incluyendo a razas que podrían atacar a todos los clones provenientes de *S. demissum* (Huerta, 1977).

El amplio interés en las razas fisiológicas de *P. infestans* y en los genes para la resistencia derivados de *S. demissum*, tuvieron como resultado la acumulación de datos de muchos investigadores de diferentes ciudades del mundo. Cada investigador usaba sus propios símbolos para designar razas y genes correspondientes (Black *et al.*, 1953). Pero en los clásicos estudios de William Black en Escocia, quien empezó a trabajar sobre la resistencia del tizón en 1932, proporcionó la base para el sistema de clasificación de razas de *P. infestans* sobre la papa. La nomenclatura de Black fue adoptada en un sistema internacional de designación de razas del oomiceto y de genes de susceptibilidad hospedero (Cuadro 1). Cuatro genes de susceptibilidad fueron reconocidos en material cultivado derivado de *S. demissum* Lindl. Cada gen es heredado independientemente en un dominante monogénico. Los genes fueron designados como R1, R2, R3 y R4. Incluyendo el recesivo, 16 genotipos fueron desarrollados por el uso de hospederos diferenciales. Y sobre la hipótesis de que cada diferencial es atacada solamente por la raza fisiológica que posea el gen o genes de patogenicidad correspondientes, así una raza del oomiceto será llamada 0 si infecta solamente la diferencial sin genes de resistencia (r). Similarmente otra sería denominada raza 1 si infecta a las diferenciales r y R1, etc. (Gallegly, 1991).

Aparentemente nuevas razas del patógeno surgen por mutación. Algunas pueden surgir por recombinación o paraxesualidad, mientras que otras surgen de reproducción sexual de *P. infestans* (Rich, 1983).

En la actualidad diversos factores pueden incrementar la patogenicidad del oomiceto. Entre ellos están la migración a nivel mundial de los dos tipos de apareamiento de *P. infestans*, lo cual implica una reproducción sexual que posiblemente incrementa la variabilidad genética, que da como consecuencia un amplio espectro de posibilidades ante nuevas condiciones que hacen más difícil el control químico y cultural de la enfermedad. Otro factor clave en la variación poblacional de *P. Infestans* lo constituye el cultivo continuo de variedades de papa con los llamados genes mayores. Estos pueden contribuir a seleccionar razas del patógeno que pueden manifestarse con una aparente mayor agresividad frente a cultivos susceptibles (Henfling, 1987).

Cuadro 1. Relación entre las plantas diferenciales de papa y sus respectivos genes de susceptibilidad con respecto a las razas de *Phytophthora infestans* de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura (Black *et al.*, 1953).

PLANTA DIFERENCIAL	Razas de <i>Phytophthora infestans</i>															
	0	1	2	3	4	1.2	1.3	1.4	2.3	2.4	3.4	1.2.3	1.2.4	1.3.4	2.3.4	1.2.3.4
r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R1	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
R2	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S
R3	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S
R4	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
R1,R2	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
R1,R3	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S
R1,R4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
R2,R3	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S
R2,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S
R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
R1,R2,R3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
R1,R2,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
R1,R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
R2,R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
R1,R2,R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

S: SUCEPTIBLE Y R: RESISTENTE

2.3. Resistencia genética

Los programas de selección de resistencia al tizón en la papa se han basado durante mucho tiempo en la introducción de resistencias monogénicas obtenidas de la especie silvestre *S. demissum*. Actualmente, 11 genes (denominados R1 a R11) se han identificado e introducido en *S. tuberosum*, aunque no representan verdaderamente más que una pequeña parte de la variabilidad disponible (Roussell *et al.*, 1999, Malconsom, 1969).

El control genético del tizón tardío en el follaje puede lograrse por dos tipos de resistencia: resistencia vertical y resistencia horizontal.

2.3.1. Resistencia vertical

Conocida también como resistencia específica de las diferentes razas. El mecanismo más frecuente de la resistencia vertical es la hipersensibilidad, aunque no es el único. Sus efectos son generalmente de carácter cualitativo, y se expresan por un grado de protección total o nulo (Cornide *et al.*, 1985). Este tipo de respuesta es controlada por genes R designados dominantes. *S. demissum* ha sido usada tradicionalmente para conferir resistencia al tizón, por cruzamientos de variedades comerciales de papa. En la actualidad se ha determinado la localización de algunos genes de este tipo, además de algunos factores genéticos cooperativos, como genes represores o silenciadores (Jaramillo y Rojas, 1997).

Los genotipos resistentes reaccionan a la rápida penetración con la muerte de las células en el sitio de infección la cual se muestra como una mancha necrótica. La reacción de

hipersensibilidad es débil y puede generar lesiones cuando se trata de los genes R2, R4, R10 o R11 (Turkensteen, 1989).

La resistencia múltiple o compleja se basa en la acumulación de genes que controlan la resistencia ante diferentes patotipos, como una vía de ganar en la estabilidad varietal (Cornide *et al.*, 1985).

En general, las variedades que muestran resistencia específica muestran resistencia completa a un patógeno en particular en la mayoría de las condiciones ambientales, pero una o varias mutaciones que ocurran en el patógeno pueden originar una nueva raza que entonces pueden infectar a la variedad anteriormente resistente. Por el contrario, las variedades que presentan resistencia general (poligénica) son menos estables y pueden variar en su reacción al patógeno bajo diferentes condiciones ambientales, pero el patógeno tendrá que pasar por muchas mutaciones para inhibir por completo la resistencia del hospedante (Agrios, 1996), tomando en cuenta que muchas razas compatibles han aparecido en casi todas las zonas de cultivo (Malcolmson, 1969).

2.3.2. Resistencia horizontal

La llamada también resistencia cuantitativa, general o parcial contra *P. infestans* se cree que es más durable que la vertical, pero puede proveer solo protección parcial. Esta consiste de componentes que afectan la eficiencia de infección, crecimiento veloz de la lesión, periodo latente y capacidad de esporulación del patógeno (Thurston, 1971), esto es facilitado por que se presenta bajo el control de muchos genes (quizá docenas o

cientos de ellos). Sin embargo cada uno de estos genes por separado es ineficaz para contrarrestar el efecto del patógeno y puede tener una función menor en la resistencia horizontal total de la planta (Agrios, 1996).

Este tipo de resistencia es caracterizada por una continua variación en apariencia fenotípica y herencia poligénica (Wastie, 1991). Ha sido derivada de especies silvestres como *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum* (Ross, 1986). Aunque existen genes R de *S. demissum* (R2, R4, R10 y R11) que no proveen resistencia completa contra *P. infestans* (Thurkensteen, 1989).

La resistencia horizontal se presenta de distintas maneras, puede ser mediante la producción de exudados tóxicos en superficies de hojas, confinamiento de las estructuras fúngicas a las paredes celulares, escasa colonización y mesófilo, colapso lento de los peciolo y reducción del rango reproductivo del patógeno, es decir se presentan barreras fisiológicas y químicas en los tejidos del huésped que dilatan el rango, la frecuencia de penetración y la producción del oomiceto (Trujillo, 2004).

2.3.3. Modelo gen por gen.

En 1940, trabajando con lino y la roya del lino, H. H. Flor hipotetizó un mecanismo genético por el cual las plantas son resistentes a patógenos. Esta hipótesis determinó el modelo de gen por gen, que sirvió como paradigma en programas genéticos en los últimos 50 años. En este modelo Flor propone que un simple gen en el hospedero puede conferir resistencia a la planta si el patógeno tiene el gen complementario por

avirulencia (Buell, 1999). Esto es, si un gen condiciona resistencia en el hospedero, hay un gen correspondiente para virulencia en el patógeno, si dos o tres genes determinan resistencia, dos o tres genes corresponden a la avirulencia en el patógeno. Esta hipótesis de gene por gen es usada para la explicación de coevolución del sistema hospedero-patógeno. La representación cuadrática de la interacción entre el gen de hospedero y patógeno designado gen para resistencia (R) y avirulencia (V) como dominante; para susceptibilidad (r) y virulencia (v) son recesivos. Tres de las combinaciones indican susceptibilidad (R-v, r-V y r-v), y una (R-V) significa resistencia (Cuadro 2). La combinación resistente requiere una interacción entre un gen para resistencia en el hospedero y un gen para avirulencia en el patógeno. Esto quiere decir que la interacción específica entre hospedero y patógeno es por incompatibilidad. La susceptibilidad es estimada como un fenómeno pasivo a la ausencia de genes para resistencia y avirulencia. Así pues, la resistencia es estimada como un proceso activo (Goodman *et al.*, 1986).

Cuadro 2. Representación cuadrática de interacción de gen hospedero-patógeno.

PATOGENO	HOSPEDERO	
	R	r
V	RV	rV
v	Rv	rv

Cuando una variedad vegetal tiene dos o mas genes de resistencia ($R_1, R_2, \dots$) contra un patógeno en particular, este debe tener dos o mas genes de virulencia ($v_1, v_2, \dots$), cada uno de los cuales debe actuar específicamente sobre uno de los genes de resistencia en el hospedante para que se produzca la infección. En el Cuadro 3, se ejemplifica

claramente varios puntos. Primero, las plantas susceptibles (v_1v_2) que carecen genes de resistencia son atacadas por todas razas del patógeno, incluso por las que carecen de genes de virulencia específicos (A_1A_2). Segundo, las razas del patógeno o los individuos que contienen genes de virulencia (v_1v_2) específicos para cada gen de resistencia del hospedante (R_1R_2) pueden infectar a todas las plantas que tengan cualquier combinación de estos genes (R_1R_2 , R_1r_2 , r_1R_2). Cuando un patógeno tiene uno de los dos genes de virulencia (v_1 o v_2), puede infectar a las plantas que tengan el gen de resistencia correspondiente (R_1 o R_2 , respectivamente), pero no a las plantas que tenga un gen de resistencia distinto del gen de virulencia correspondiente (por ejemplo, los patógenos que tienen genes V_1v_2 infectaran a las plantas que tengan genes r_1R_2 , pero no a las que tengan genes R_1r_2 debido a que al gen v_2 puede atacar el gen R_2 pero el gen V_1 no pueden atacar al gen R_1) (Agrios, 1996).

Cuadro 3. Representación cuadrática de dos genes de resistencia hospedero-patógeno.

Genes de virulencia o avirulencia.	Genes de resistencia en la planta			
	R_1R_2	R_1r_2	r_1R_2	r_1r_2
V_1V_2	—	—	—	+
V_1v_2	—	—	+	+
a_1A_2	—	+	—	+
a_1a_2	+	+	+	+

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

2.4. Reconocimiento del patógeno

La activación de defensa inducida es disparada por un reconocimiento específico del patógeno a la invasión de la planta. La percepción en resistencia hospedero específico involucra receptores con alto grados de especificidad por el patógeno afín, los cuales son codificados por genes R expresados constitutivamente y localizados sobre la membrana plasmática o en el citosol (Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

Los componentes mayores de la señal de transducción cambian por la percepción del elicitor al gen de activación. El reconocimiento del elicitor por el receptor de la membrana plasmática estimula los influjos de H^+ y Ca^{+} , y flujos de K^{+} y Cl^{-} . Este flujo de iones son prerequisites para la activación específica de proteínas activadas mitogénicas (MAP) quinasas y para la generación del estrés oxidativo. La fosforilación y la desfosforilación de algunas proteínas también es observada. La estimulación del elicitor es obligatorio así como también la producción de Ácido Jasmónico por la membrana asociada a la fosfolipasa. Sin embargo la asociación de la ruta del jasmonato no es esencial para iniciar la respuesta de defensa (Somssich y Hahlbrock, 1998).

2.4.1. Elicitor

Los elicitores, fueron originalmente definidos como componentes de origen microbial que inducen acumulación de fitoalexinas. En la actualidad se definen como componentes que inducen algunas o toda una serie de respuestas de defensa en la planta, incluyendo RH, fuga de electrolitos, necrosis, biosíntesis de etileno y proteínas relacionadas con la

patogénesis (Walton, 1997). Estos son frecuentemente de bajo peso molecular y son sintetizados o liberados por precursores poliméricos durante la infección. Su estructura química presenta una gran variedad, como las glucoproteínas, péptidos y oligosacáridos (Odjakova y Hadjiivanova, 2001). Un ejemplo de elicitor lipídico de *P. infestans* es el ácido araquidónico localizado en la membrana celular del patógeno (Walton, 1997).

Un elicitor en particular no necesariamente elicitó todas las reacciones de defensa de la planta, por ejemplo el etileno dispara síntesis de proteínas PR pero no acumulación de fitoalexinas (Walton, 1997). Otra participación muy importante es en la membrana plasmática en la actividad redox donde durante la elicitación hay producción de ROS, generado por el transporte de electrones, donde un electrón donador citoplasmático a un electrón aceptor externo, es mediado por la membrana (Vera-Estrella *et al.*, 1994).

2.5. Mecanismo de defensa a nivel membrana celular

La asociación de especies de oxígeno activo con la inducción de la respuesta de defensa a patógenos ha sido demostrada en diversas interacciones planta-patógeno. El origen de las especies de oxígeno activo, principalmente, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) han estado ligados a cambios en la membrana plasmática. En plantas las principales enzimas antioxidantes de la membrana plasmática a nivel citosol son la catalasa y la superóxido dismutasa, las cuales reaccionan con las formas activas de oxígeno, ascorbato peroxidasa y glutamina reductasa las cuales regeneran antioxidantes (Vera-Estrella *et al.*, 1994)

2.5.1. Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS)

El término de estrés oxidativo se tomó prestado de la literatura de las células neutrófilas, para describir la primera fase de la producción rápida de especies reactivas de oxígeno. En plantas se documentó por primera vez en tubérculos de papa tratados con la raza incompatible de *P. infestans*. En esos estudios se demostró con la inoculación del patógeno que se estimuló la producción de citocromo c (Camarena, 2006).

La rápida generación del anión superóxido y peróxido de hidrógeno se ha demostrado en muchos estudios de respuesta hipersensitiva con bacterias y hongos avirulentos o con patógenos virales. Los estudios mas recientes revelan que la generación de las especies reactivas de oxígeno ocurre en dos fases. La fase I que sucede minutos después de la adición del patógeno y es una reacción biológicamente no específica, mientras que la fase II comienza tres horas después de que la fase inicial ha terminado, la cual depende de la expresión *avr* en la interacción planta-patógeno y la expresión del grupo de genes *Hrp* o genes de la RH y patogenicidad (Camarena, 2006).

La producción de ROS juega un papel clave en la defensa de la planta ya que es la primera respuesta activada en muchas interacciones incompatibles la cual dispara el inicio de RH (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Estas especies también pueden estar involucradas en la oxidación de lípidos de membrana que resultan de la producción de varios componentes fúngicos, iniciación de lignificación de la pared celular directa a la herida del patógeno y señal de transducción (Vidhyasekaran, 1997).

Las ROS son parcialmente la forma reducida de oxígeno molecular (O_2) continuamente producidas en células durante el metabolismo aeróbico. Estos pueden causar extensas heridas o muerte celular y también juegan un papel principal en muchas señales de rutas metabólicas en plantas involucradas en: percepción de estrés, regulación de fotosíntesis, respuesta a patógenos, programación de muerte celular, acción hormonal y crecimiento, y desarrollo de la planta (Davletova *et al.*, 2004).

La actividad enzimática de las ROS mejor estudiada es la de NADPH oxidasa. La intensidad, duración y localización de las diferentes señales son determinadas por un juego intermedio entre la producción de ROS y la ruta de almacenamiento de ROS en la célula. Estos procesos requieren una manera acelerada de regulación y podrían involucrar amplificación y/o inhibición de reacciones (Mittler, 2004).

Cuando los patógenos invaden los tejidos hospederos se producen diferentes radicales de oxígeno. El anión superóxido (O_2^-) lleva un electrón sin aparear que surge de la reducción de un oxígeno molecular. El O_2^- extracelular en células de plantas puede ser generado en un número de rutas NADH/NADP⁺ y es oxidado a NAD⁺/NADP en la presencia de peroxidasa y M^{2+} , de la reducción de O_2^- , una catalización específica de la membrana NAD(P)H oxidasa puede catalizar la reducción de oxígeno molecular. El superóxido (O_2^-) es producido en papa en interacciones incompatibles con *P. infestans* (Vidhyasekaran, 1997).

2.5.2. Superoxido Dismutasa (1.15.1.1; SOD)

Las superóxido diamutasas son una familia de metaloenzimas que catalizan la degradación de radicales O_2^- , estas juegan un papel importante en la protección de la células contra los efectos tóxicos de radicales superóxidos producidos en diferentes loci celulares (del Rio, 2003).

La SOD es la primera en los procesos de detoxificación, esta degradación de O_2^- a H_2O_2 , el cual es reducido a H_2O por catalasa en peroxisomas y ascorbato peroxidasa en cloroplastos y citosol (Papadakis *et al.*, 2001). Tal es el caso del chícharo que contiene izoenzima SOD Cu/Zn y se localizan en cloroplastos y citosol, mientras SOD Mn se localiza en la mitocondria. El tabaco es el más complejo ya que incluye al menos cinco izoenzimas distintas, SOD Fe en cloroplastos, SODs Cu/Zn en cloroplastos y citosol y SOD Mn en mitocondria (Gupta *et al.*, 1993)

Esta enzima probablemente protege a las células de la toxicidad del oxígeno. La alta producción de superóxido reactivo generado enzimáticamente o no enzimáticamente bajo alta tensión de oxígeno es transformado a H_2O_2 por la superoxido dismutasa (Huang *et al.*, 1983).

2.5.3. Peroxidasa (EC 1.11.1.7; POX)

La peroxidasa cataliza la deshidrogenación estructuralmente de sustratos fenólicos por H_2O_2 y son por consiguiente consideradas como enzimas antioxidantes (Djanaguiraman *et al.*, 2004). Esta enzima en plantas se localiza principalmente en la pared celular y en

vacuolas. La raíz de las plantas exuda altas concentraciones de peroxidasa en suelo, particularmente en respuesta al estrés hídrico y químico. Esta enzima ha sido implicada en diversos fenómenos observados en plantas como: lignificación, suberización, elongación celular, crecimiento y regulación de la biosíntesis de la pared celular y plasticidad. También ha mostrado ser valiosa como marcador de la reacción en plantas al estrés ambiental externo. El Guaiacol es un sustrato metabolizado por un amplio rango de POX, sin embargo este puede servir como marcador general de actividad de la POX. La actividad de la peroxidasa es más pronunciada en raíces que en hojas (Khan y Chaudhry, 2006).

La peroxidasa en combinación con SOD puede minimizar la acción tóxica de ROS en interacciones susceptibles. Esto fue demostrado con *Dreschlera gramea* de alta virulencia (Vidhyasekaran, 1997).

Goodman *et al.*, (1986) mencionan que la actividad de la peroxidasa gradualmente decrece en hojas jóvenes, cáscara del tubérculo y pulpa respectivamente. La resistencia en órganos particulares a la infección decrece en correlación con la disminución en la actividad de la enzima.

2.6. Mecanismos bioquímicos de defensa

Las plantas exhiben resistencia natural a enfermedades, lo cual involucra mecanismos de defensa inducibles que son disparados solo por el intento de infección, los cuáles activan biosíntesis de metabolitos secundarios antimicrobiales de bajo peso molecular

(fitoalexinas), deposición de material lignínico e incremento en la actividad de enzimas hídrolíticas, muerte celular y síntesis de proteínas que inhiben al patógeno (Bell *et al.*, 1986; Walton, 1997).

2.6.1. Respuesta Hipersensitiva (RH)

La resistencia de las plantas a enfermedades de patógenos como hongos, bacterias y virus frecuentemente depende de si la planta es competente a reconocer al patógeno en los procesos tempranos de infección. El evento del reconocimiento conduce a una rápida necrosis en el sitio de infección, el cual es nombrado Respuesta Hipersensitiva. Esta respuesta priva al patógeno de nutrientes y/o libera moléculas tóxicas y de ese modo restringe el crecimiento del patógeno de una región de la planta, por tal motivo este proceso es reconocido como mecanismo de defensa activa (Franzen, 2000). De igual forma provee resistencia a la gran mayoría de patógenos potenciales (no hospederos o especies resistentes). Para una especie de planta dada, un número mas limitado de falsos patógenos exhiben la habilidad a evadir el sistema de reconocimiento del hospedero y crecimiento extensivo sin provocar necrosis en el hospedero o solo después un considerable retraso. Estas observaciones indican que hay una evolución de la habilidad de la planta hospedera a reconocer razas patógenas (Mehdy, 1994).

El reconocimiento del patógeno dispara una amplia gama de mecanismos de defensas inducibles que son para a la resistencia de total de la planta. Estos se activan cuando la planta percibe las señales moleculares del patógeno (elicitors) reconocidos por los

genes de avirulencia (*Avr*) los receptores específicos, que a su vez son reconocidos por genes R interactúan directamente con elicitores, de este modo inicia la señal de respuesta de defensa a la enfermedad dando como resultado el mecanismo inducido en el sitio de infección e incluyendo síntesis de compuestos antimicrobiales (fitoalexinas), acumulación de componentes fenólicos (Kamoun *et al.*, 1999), síntesis de enzimas hidrolíticas que atacan al hongo o bacteria y alteraciones en la síntesis de proteínas estructurales de la pared celular (Mehdy, 1994).

Generalmente la RH es asociada con interacciones incompatibles, aunque las características microscópicas de tejido necrótico en algunas interacciones compatibles son idénticas a RH (Desender *et al.*, 2007). La expresión de genes de defensa codifican proteínas relacionadas a la patogénesis o enzimas involucradas en el metabolismo secundario como la fenilalanina-aminoliasa y producción de componentes antimicrobiales de bajo peso molecular que constituyen a más procesos claves en la defensa de la planta (Zeier *et al.*, 2004).

Desender *et al.*, (2007) mencionan que la HR en hojas de tabaco puede ser disparada por una variedad de elicitores, incluyendo harpinas, replicación del virus mosaico del tabaco (TMV), elicinas, proteínas de bajo peso molecular de todas las especies de *Phytophthora* y durante el establecimiento de RH, se expresan dos grupos de genes, el primer grupo corresponde a genes específicos para la inducción de HR, los cuales son expresados solo en interacciones incompatibles, el segundo grupo se expresado en niveles similares en interacciones incompatibles y compatibles. Además la RH, involucra en interacciones incompatibles cambios fisiológicos tempranos incluyendo

flujo de electrolitos, biosíntesis de ROS, lipoperoxidación en la membrana y fuga citoplasmática.

2.6.2. Componentes fenólicos

Los fenoles en plantas comprenden un diverso grupo de fitoquímicos, que abarcan desde ácidos fenólicos a complejos polímeros como taninos y ligninas. Los fenoles se caracterizan por anillos aromáticos llevando uno o mas grupos hidroxilo y la mayoría de los componentes conocidos son derivados del ácido shikímico y de la ruta de los fenilpropanoides. De la clase mayor de los fitoquímicos, los fenoles son los mas comúnmente inducidos por estrés como exceso de luz, UV, frío, deficiencia de nutrientes, ataques de herbívoros y patógenos (Constabel, 1999).

Estos componentes son de gran importancia como soporte de material celular. Llegan a formar una parte integral de la estructura de la pared celular, principalmente en materiales poliméricos como las ligninas y suberinas para el soporte mecánico y barreras contra invasión microbiana (Strack, 1997). También son comúnmente encontrados tanto en plantas comestibles como no comestibles y se ha reportado que tienen efectos biológicos múltiples, incluyendo actividad antioxidante (Kähkönen *et al.*, 1999).

Vidhyasekaran (1997) menciona que la presencia de componentes fenólicos en plantas o su síntesis en respuesta a una infección, han estado asociados con la resistencia contra hongos patógenos. Tal es el caso de una planta de tomate susceptible con tratamientos de

ácido quínico o fenilalanina que incrementa el contenido de componentes fenólicos y la resistencia contra *Fusarium oxysporium f.sp. lycopersici*.

Rubio-Covarrubias *et al.*, (2006) demostraron que la concentración de componentes fenólicos en células epidérmicas de hojas de papa son influenciadas por la temperatura y el fotoperíodo, donde la resistencia a la penetración de *P. infestans* dentro de células epidérmicas estuvieron correlacionadas con el nivel de resistencia de los cultivares, pero no con el contenido de fenoles. También observaron que todos los cultivares tuvieron similar deposición de componentes fenólicos (sobre los estomas, en la pared celular y en la célula completa) después de la inoculación y que los diferentes tipos de reacción fueron independiente del tipo y nivel de resistencia.

El incremento en fenoles totales en células infectadas indica que también están empezando a ser sintetizadas durante la infección también transportadas alrededor del tejido. Si la síntesis *de novo* ha ocurrido, la actividad de la PAL podría tener un incremento simultáneamente o ligeramente en avance de la acumulación observada de fenoles. Un caso de incremento en la actividad de la PAL fue encontrado en la infección de tejidos de tomate a partir de la síntesis *de novo* de fenoles (Vidhyasekaran, 1988).

2.6.3. Fitoalexinas

Müller y Böger (1940) emplearon el término de *fitoalexinas* para describir las sustancias producidas por el hospedante al ser invadido por el patógeno y que inhiben el desarrollo de los hongos (Cornide *et al.*, 1985). Estas sustancias actualmente constituyen un grupo

químico heterogéneo de más de 150, que han sido detectadas en plantas infectadas con patógenos, las cuales pertenecen a tres grupos (fenilpropanoides, terpenoides y derivados de ácidos grasos) y a varias clases de componentes: isoflavonoides, estilbenos, cumarinas, sesquiterpenos, diterpenos, poliacetilos y otros (Vidhyasekaran, 1997).

Las fitoalexinas son componentes antimicrobiales y lipofílicos de bajo peso molecular que son acumulados rápidamente alrededor del sitio de infección del patógeno incompatible en respuesta a un extenso surtido de elicitores bióticos y abióticos. La biosíntesis de fitoalexinas ocurre después un desvío del precursor primario metabólico entre la ruta metabólica secundaria. Este desvío frecuentemente surge de la inducción *de novo* de enzimas como la PAL, la cual es clave control en la ruta biosintética. Sin embargo la biosíntesis para generar más fitoalexinas necesita la actividad de numerosas enzimas, altamente coordinadas señalando eventos que pueden ser requeridos en las células atacadas para establecimiento sucesivo de este tipo de respuesta de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

2.6.4. Fenilalanina Amonio-Liasa (EC 4.3.1.5; PAL)

La PAL una enzima importante en el metabolismo de los compuestos fenólicos, que cataliza la desaminación de la L-fenilalanina a ácido transcinámico, un importante precursor para los compuestos flavonoides. Esta importante enzima cataliza la reacción de ramificación de la molécula, en la vía que lleva al ácido shikímico abriéndola a un amplio rango de productos secundarios como lignina, fenoles y cumarinas, así como

flavononas y antocianinas. Una cuestión interesante es que la actividad de la enzima es afectada por una gran variedad de factores externos e internos, varía según el estado de desarrollo de la planta (Bidwell, 1979; Ohl *et al*, 1990).

La actividad de la PAL aumenta considerablemente en zonas donde se ha producido una infección fúngica, así pues parece que los genes responsables de la síntesis de la enzima pueden responder a la presencia de elicitores biológicos, sintetizando mRNAs correspondientes, que se traducirán en proteínas con actividad de la PAL (Azcon y Talon, 1993).

Esta enzima juega un papel clave en el desarrollo de la resistencia a patógenos en plantas, los cambios en la actividad y la transcripción generalmente no ocurren en interacciones compatibles. El apagado de los genes de la PAL parece ser uno de los primeros pasos en el desarrollo del patógeno en hospederos susceptibles (Vidhyasekaran, 1997).

Yoshioka y Duke (1994) mencionan que Fritzermeier *et al* (1987) reportaron que la activación transcripcional de la PAL ocurrió dentro de los 30 minutos en hojas inoculadas con razas de *P. infestans* compatibles e incompatibles. Mientras que Vidhyasekaran (1997) menciona que la actividad de la PAL incrementa rápidamente a un alto nivel en raíz de *Eucalyptus calphylla*, en especies resistentes a *Phytophthora cinnamomi* después de la infección del patógeno. En especies susceptibles, sin embargo en *E. marginata*, la actividad de la PAL incrementó solo ligeramente después de la inoculación con el hongo en las primeras 24 horas. Subsecuentemente un rápido declive

en la actividad de la PAL fue observado y después de 96 horas de la inoculación la actividad de la PAL incrementó al 77% de los niveles del testigo. La importancia en la supresión de la PAL resulta en una reducción en la síntesis de compuestos fenólicos fue mostrado usando al ácido aminooxiacético (AOA), inhibidor de PAL.

2.7. Activación de la reacción de defensa en plantas.

La Figura 1 muestra la reacción de defensa de la planta que da inicio con el reconocimiento del elicitor por la membrana plasmática receptora estimulando la entrada de H^+ y Ca^{+} y flujos de K^{+} y Cl^{-} . Este flujo de iones es prerequisite para la activación de MAP quinasa y esta a su vez activa a la NAD(P)H oxidasa para la fosforilación y desfosforilación de algunas proteínas. Alternativamente el elicitor estimula a la SOD, la cual dismuta al radical oxígeno ($O_2^{\cdot}$), aunque también la dismutación se da por vía no enzimática, dando como resultado peróxido de hidrógeno. (Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

El H_2O_2 activa la acción de la POX para el inicio de la peroxidación de lípidos a través del radical hidroxilo ($H^{\cdot}$). Otra de las funciones del peróxido de hidrógeno es la activación de los genes de defensa a través de la alteración del mecanismo redox, uno de esos genes activa a la PAL. Este mecanismo proporciona a los tejidos infectados precursores de naturaleza fenólica, susceptibles de transformarse en fitoalexinas que actuaran como defensa ante la infección (Azcon y Talon, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en dos fases, campo y laboratorio. La fase de campo se realizó en los campos experimentales de PICTIPAPA (Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa) en Metepec, Edo de México; lugar donde se presentan las condiciones climatológicas favorables al desarrollo del tizón tardío, ocasionando un severo ataque cuando la humedad relativa es superior al 90% de 8 ó 10 hrs en varios días consecutivos. La fase de laboratorio se llevó acabo en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2. Material biológico

Se usaron plantas diferenciales de *Solanum* spp., las cuales fueron generosamente proporcionadas por el banco de germoplasma del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Sturgeon Bay, Wisconsin.

Diferenciales de *Solanum* spp.

R-1	R-9
R-2	R-10
R-3	R-11
R-4	R-1,2,4
R-5	R-1,2,3,4
R-6	R-1,3,4
R-7	R-2,3,4
R-8	R-MULTI

Se incluyó la variedad Alpha como testigo susceptible al patógeno

3.3. Fase de campo

La siembra se realizó el 4 de Junio 2006, en macetas teniendo un tubérculo por maceta y con sustrato de turba de peatano, bajo invernadero. Al tubérculo no se le aplicó ningún tratamiento. El trasplante al campo se realizó el 19 de julio, donde se realizó el siguiente programa de trabajo:

Se realizaron dos fertilizaciones; una antes de la siembra con la fórmula 120-180-120 más 20 kg de Ca y 10 kg de Mg por hectárea. La segunda fertilización se hizo a los 53 días después de la siembra con 60 kg d N ha⁻¹ al momento de la escarda. Se aplicó un herbicida preemergente (Sencor a una dosis de 850 ml ha⁻¹).

Se dio inicio a la toma de lectura a los ocho días de estar en la parcela, realizando un total de 10 lecturas, de acuerdo a la escala de Henfling (1987) (Apendice 1) y posteriormente se realizó una curva de progreso de la enfermedad. Se realizaron dos tomas de follaje para R-9, R-10 y R-1,2,4 donde el primer muestreo es asignado con la letra "A" y el segundo letra "B". Para las diferenciales R-1,3,4 y R-5 solo se realizó el último muestreo por falta de follaje en la primer fecha. Las plantas que no se presentaron en los resultados se debió a que durante el ciclo del cultivo presentaron un severo ataque que no permitió tomar follaje y como se mencionó anteriormente alguna presentaron poco follaje.

3.4. Fase de laboratorio

Para la determinación de la actividad enzimática se preparó polvo de acetona. A partir de los 30 g o menos de folíolos de papa colectados en campo más 50 ml de acetona al 100% a 4°C, la muestra se molió en licuadora, se filtró al vacío recuperando el sobrenadante. Este proceso se repitió en el mismo tejido de dos a cuatro veces de acuerdo a la cantidad de folíolo pesado, y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se etiquetó y se conservó en refrigeración a 4°C hasta el ensayo de las enzimas Superoxido Dismutasa, Peroxidasa y Fenilalanina amonio-liasas. El sobrenadante se etiquetó y se conservó en refrigeración el cual se utilizó para la determinación de fenoles.

3.4.1. Determinación de fenoles

La cuantificación se realizó estableciendo una curva estándar de ácido tánico, de acuerdo con lo descrito por la Association of Official Analytical Chemists (1990).

Se disolvieron 10 mg de ácido tánico en 10 ml de agua desionizada y se tomaron 2 ml de la solución la cual fue aforada a 100 ml, y se obtuvo una concentración de 20 µg/ml. Se tomaron alícuotas de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ml y se depositaron en tubos de ensayo. Posteriormente se le adicionó a cada tubo agua desionizada en el mismo orden 16, 15.5, 15, 14.5, 14, 13.5, 13 y 12.5 ml. Por último se le agregó 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu más 2 ml de solución de Na₂CO₃ al 20%. Se obtuvo un volumen total de 20 ml en cada tubo. Se mezcló perfectamente y se dejó reposar en la oscuridad durante 2 h y se

registro la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro. Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). Con una probeta se midió el sobrenadante de cada una de las muestras y se anotó en la bitácora. En un tubo de ensayo se colocaron 0.03 ml de sobrenadante y 16.97 ml de agua desionizada. Se le agregó 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de ocho minutos se adicionó la solución de Na_2CO_3 al 20% y se agitó perfectamente. Los tubos se dejaron reposar en la oscuridad durante 2 h y después se tomó lectura a 260 nm en el espectrofotómetro. La concentración se reportó como mg fenoles por gramo de peso fresco (mg/g).

3.4.2. Determinación de actividad enzimática PAL.

Para este análisis se utilizó la metodología descrita por Martínez-Téllez y Lafuente (1997).

A partir de 0.005 ó 0.025 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano. Se le añadió 5 ml de borato sódico 0.1M (pH 8.8) frío con 20mM β -mercaptoetanol. Y se homogenizó durante 50 s en frío. Ya homogenizado se filtró con manta de cielo directamente en tubos de centrifuga y se taparon con parafilm, posteriormente las muestras se centrifugaron por 20 min a 16 000 Xg con una temperatura de 4°C. Se filtró el sobrenadante con manta de cielo, directamente en tubos calibrados y se midió el volumen. Se regresó el sobrenadante a tubos de centrifuga limpios. Para precipitar la enzima se usó sulfato de amonio, donde por cada ml de sobrenadante se pesó 0.46g de la

sal. Se añadió y se tapó con parafilm después se agitó en el vortex hasta disolver perfectamente la sal. Se agitó la mezcla por 30 min en baño con hielo a 4°C y se enviaron nuevamente a centrifugar por 20 min a 16 000 Xg con temperatura de 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se le pasó papel secante por el borde para eliminar las gotas que quedaban y la pastilla se disolvió en 4.5 ml de acetato de amonio 0.1 M (pH 7.7) con 20mM de β -mercaptoetanol, se tapó con parafilm y se agitó en el vortex.

Ensayo de actividad de la PAL.

Se utilizaron dos series de tubos para cada planta diferencial con sus respectivas repeticiones. En la serie 1, donde se obtuvo la absorbancia de la enzima de cada planta diferencial, se le añadió 2 ml de extracto + 3.4 ml de H₂O grado HPLC + 0.6 ml de L-fenilalanina. En la serie 2, donde se obtuvo la actividad de la enzima como tal, se le añadió 2 ml de extracto + 4 ml de H₂O grado HPLC. Se colocaron ambas series de tubos a baño maría con una temperatura de 40°C. Se evaluó cambio de absorbancia a los 5 min y a las 2 hr a 290 nm (luz ultravioleta), manteniendo la muestra en baño maría. La actividad enzimática se reportó como U/g de PAL/g de peso fresco donde $U = \Delta$ (absorbancia) a 290 nm h⁻¹.

3.5.3. Determinación de actividad enzimática POX

El análisis se realizó de acuerdo al método modificado de Alia-Tejacal *et al.*, (2002)

A partir de 0.005 ó 0.025 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano. Se homogeneizó durante 50 s con 5 ml de Tris-HCL (pH 7.1) con un contenido de 1%

polivinilpirrolidona (PVP) frío. La mezcla se centrifugó por 30 min a 15 Xg con temperatura de 4°C. La determinación de la actividad se realizó de acuerdo a Flurkey y Jen (1978). Añadiéndosele 2.6 ml de Tris-HCL (pH 7.1) + 1 ml de peróxido de hidrogeno al 0.25% + 0.25 ml de guaiacol 0.1 M + 0.05 ml de sobrenadante. Dado que en algunas muestras no se detectaba actividad o la actividad se disparaba se hicieron pruebas a diferentes cantidades de sobrenadante y las cantidades que se utilizaron fueron de 0.03 y 0.09 ml de sobrenadante. El cambio de absorbancia se evaluó a 30, 60, 120 y 180 s a 470 nm., y la actividad enzimática se reportó como Ug de POX de peso fresco (U= unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 nmol min⁻¹ de tetraguayacol).

3.4.4. Determinación de actividad enzimática de SOD.

La actividad de SOD se evaluó con el método propuesto por Beyer y Fridovich (1987).

A partir de 0.005 ó 0.025 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano. Se le agrego 5 ml de solución buffer fosfatos (pH 7.8) frío y se homogenizó durante 50 s en frío. La mezcla se centrifugó por 20 min a 12 500 Xg con temperatura de 4°C y con la luz apagada se sacaron las muestras para que tomaran temperatura ambiente. A los tubos de rosca se les agregó 3 ml de la solución preparada con amortiguador fosfatos + 27 ml de EDTA + 1.5 ml de metionina + 1.0 de NBT y 0.75 de Triton X-100, más 0.5 ml de sobrenadante y se agitó. Por último se le agregó 0.03 ml de riboflavina y se volvió a agitar vigorosamente. El tubo testigo lleva todo menos riboflavina. Se llevaron al cuarto

oscuro con luz fluorescente (4 lámparas Osmar marca Red Slimline 75 W, luz de día echo en México) durante 7 min y se evaluó cambio de absorbancia a 560 nm. La actividad enzimática se reporta en unidades internacionales por gramo de peso fresco (U g⁻¹ pf), cada unidad es igual a la cantidad del sobrenadante que fotoinhibe la formación de 50% de azul de nitro tetrazolium formazan.

3.5. Análisis de datos

Los resultados fueron analizados con ayuda de Excel y del programa estadístico NCSS 2007 (Number Crunching Statistical System). Con los cuales se obtuvieron graficas de relación, de infección y correlaciones de las enzimas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Incidencia de razas fisiológicas

Las condiciones climatológicas durante el ciclo del cultivo en Metepec, Méx. mostraron humedad relativa superior al 90% (barras, parte superior, Apéndice 2), temperatura entre 10 y 15°C y nubosidad (parte inferior, Apéndice 2).

Las primeras razas en aparecer, durante la segunda quincena de julio, fueron R-2,3,4, con un grado de susceptibilidad similar al testigo, cv Alpha. Posteriormente, durante agosto, se identificaron a la mayoría de ellas, y las últimas en presentarse fueron la R-5 y R-9 (Figura 2). Este tipo de comportamiento se ha detectado en los años anteriores¹, con lo que se comprueba repetidamente que en el valle se encuentran todas las razas fisiológicas del patógeno y sus posibles combinaciones. Además, estos resultados respaldan la certeza de que en los programas de selección de papa para resistencia al tizón, se están seleccionando genotipos con resistencia horizontal, es decir, contra una gran amplitud de razas fisiológicas del patógeno.

La secuencia en la aparición de razas fisiológicas a lo largo del periodo del cultivo demuestra que no existe un orden definido como podría ser que las razas simples aparecieran al inicio de la enfermedad y posteriormente encontrar razas más complejas.

¹ Claudia R. Belmar Díaz, comunicación personal.

Era de esperarse que al principio de la enfermedad se encontrara un mayor número de razas fisiológicas ya que en la tercera semana (10 de agosto) se presentan lecturas de la mayoría de las plantas diferenciales.

A partir de la sexta semana (23 de agosto) hubo un mayor porcentaje de infección y de acuerdo con Grainger (1956) el contenido de carbohidratos de las plantas influye en la susceptibilidad, cuando la cantidad de carbohidratos es baja (durante la época de mayor crecimiento de la planta) la susceptibilidad es mayor.

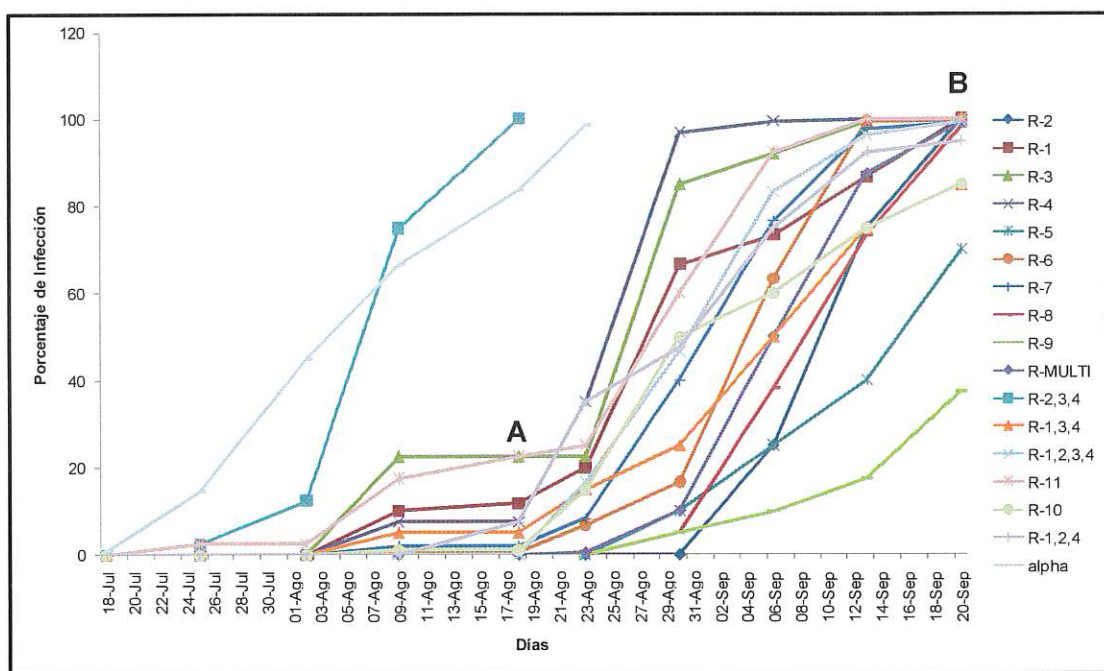


Figura 2. Secuencia de aparición de las razas del tizón en función de las plantas deferenciales de *Solanum* spp. ICAMEX/PICTIPAPA, Metepec, Méx., 2006. A, quinta semana; B décima semana.

4.2. Fenoles totales

La curva patrón de fenoles (Apéndice 4) mostró un ajuste aritmético con una $R^2 = 0.990$. El modelo de regresión de la curva sirvió para determinar la cantidad de fenoles totales de las muestras evaluadas.

En las diferenciales R-9 (A), R-10 (A) y R-1,2,4 (A) se presentó alto contenido inicial de fenoles (Figura 3). La infección activó los genes que provocaron la síntesis y transporte de fenoles alrededor del tejido para establecer una barrera de protección contra el patógeno. Los fenoles son oxidados a quinonas por enzimas del hospedero como la polifenol-oxidasa y la peroxidasa. Estas quinonas son compuestos fungitóxicos, lo que evita el avance del patógeno en su intento de provocar la infección (Vidhyasekaran, 1988)

Basha *et al.*, (2006) mencionan que las plantas pueden acumular fenoles a través de la ruta de los fenilpropanoides con la activación de la PAL como un medio de defensa pasiva y la magnitud de esta acumulación es proporcionada principalmente de la L-fenilalanina. La lignina proviene de la ruta de los fenilpropanoides, la cual es una primera reacción de defensa para evitar la penetración o la formación de la papila del patógeno. Este mecanismo probablemente se presentó cuando se realizó el primer muestreo de la plantas por lo tanto aumento en la concentración de fenoles, y su toxicidad varia dependiendo de su estructura, algunos inhiben la producción de enzimas fúngicas e inactivan la producción enzimática del patógeno (Vidhyasekaran, 1997)

Para el segundo muestreo el análisis de todas las diferenciales mostraron bajo contenido de fenoles como consecuencia de que la infección estaba en aumento y la síntesis de fenoles ya no correspondía a la defensa de la planta sino a los retoños.

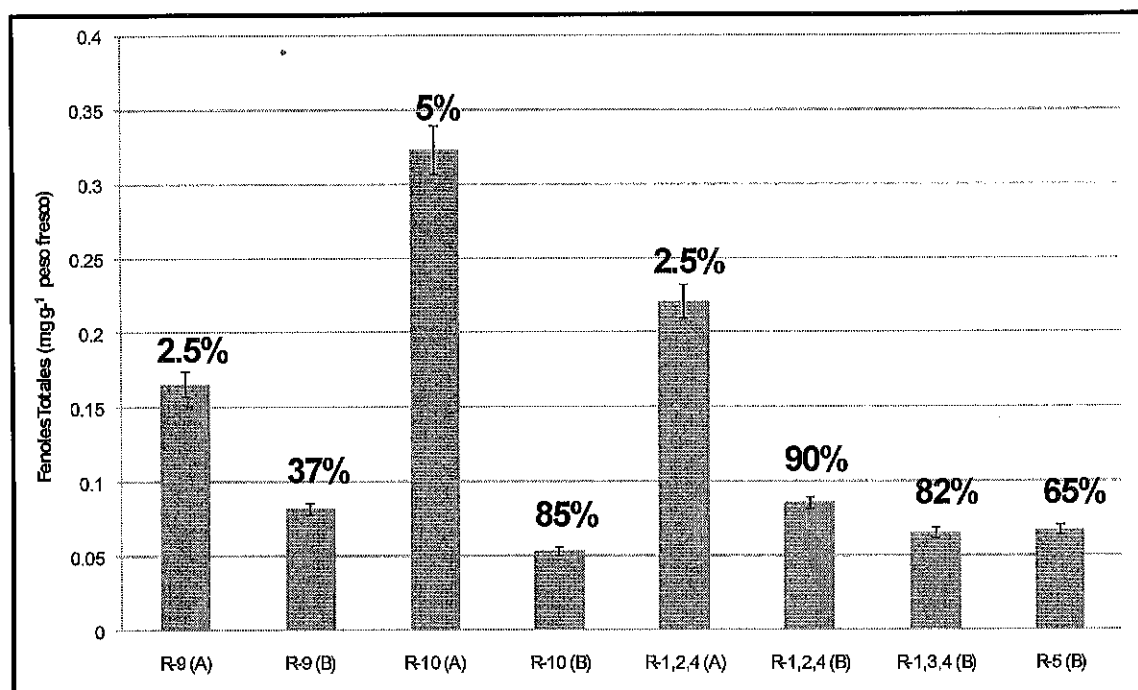


Figura 3. Cuantificación de Fenoles Totales en plantas diferenciales de *Solanum* spp. A (quinta semana) y B (décima semana) y porcentaje de infección.

4.3. Actividad enzimática PAL

Se observó mayor actividad PAL en las diferenciales R-9 (A) y R-10 (A), para el primer muestreo (Figura 4). De acuerdo a Azcon y Talon (1993), hay un aumento considerable de PAL en zonas donde se ha producido una infección fúngica ya que los genes responsables de la síntesis de la enzima pueden corresponder a la presencia de los elicitores.

Mientras que para el segundo análisis la diferencial R-9 y R-10 (B) presentaron disminución de la actividad, esto se debió a la presencia de follaje nuevo en el cual no se presentaban síntomas de necrosis en la mayoría de las hojas de toma de muestra. Por lo tanto no se presentó reconocimiento de elicitores que provocaran el desencadenamiento de una mayor actividad

Para R-1,2,4 (A) (Figura 4), en el primer análisis se presentó baja actividad enzimática, probablemente la planta para esa fecha todavía no presentaba establecimiento del patógeno, indicando así que la raza 1,2,4 presentaba poco tiempo de haber llegado al campo, tomando en cuenta la lectura de infección que se presentó hasta esa fecha (2.5%). Sin embargo PAL se presenta en todos los estadios de crecimiento como lo menciona Jones (1984), que esta enzima es sensible a los estados fisiológicos de la planta y la actividad puede sufrir cambios durante el crecimiento o por eventos patológicos. Pero ocurrió lo contrario con R-1,2,4 (B), ya que se presentó aumento de actividad. Para la fecha del ultimo muestreo la raza de *Phytophthora infestans* 1,2,4 ya había llegado a campo, por lo tanto ya había sido reconocida por la planta provocando así la expresión de genes de defensa.

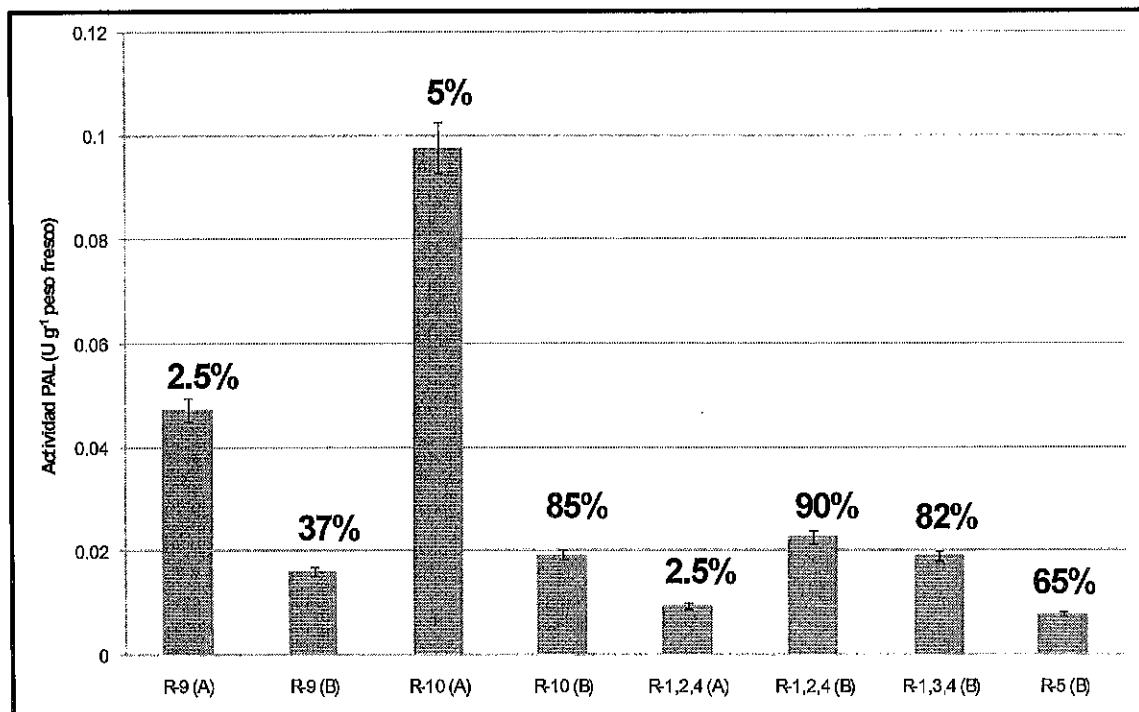


Figura 4. Actividad PAL en plantas diferenciales con muestreo A (quinta semana) y B (décima semana) y porcentaje de infección.

4.4. Actividad enzimática POX

En el primer muestreo las diferenciales R-9 (A), R-10 (A) y R-1,2,4 (A) presentaron mayor actividad que en su segundo análisis (Figura 5). Además POX ejecuta un rol antioxidante catalizando la deshidrogenación de sustratos fenólicos y endólicos por H_2O_2 (Djanaguiraman *et al.*, 2004), mostrando así su capacidad de defensa ante el patógeno.

En el segundo análisis, se presentó una actividad muy baja. Goodman, *et al* (1986) mencionan que la actividad disminuye en hojas jóvenes, maduras, cáscara del tubérculo y pulpa. Y para la semana diez estas diferenciales presentaron follaje joven

(Apéndice 4) y ese tipo de material biológico provocó la actividad baja en las plantas diferenciales.

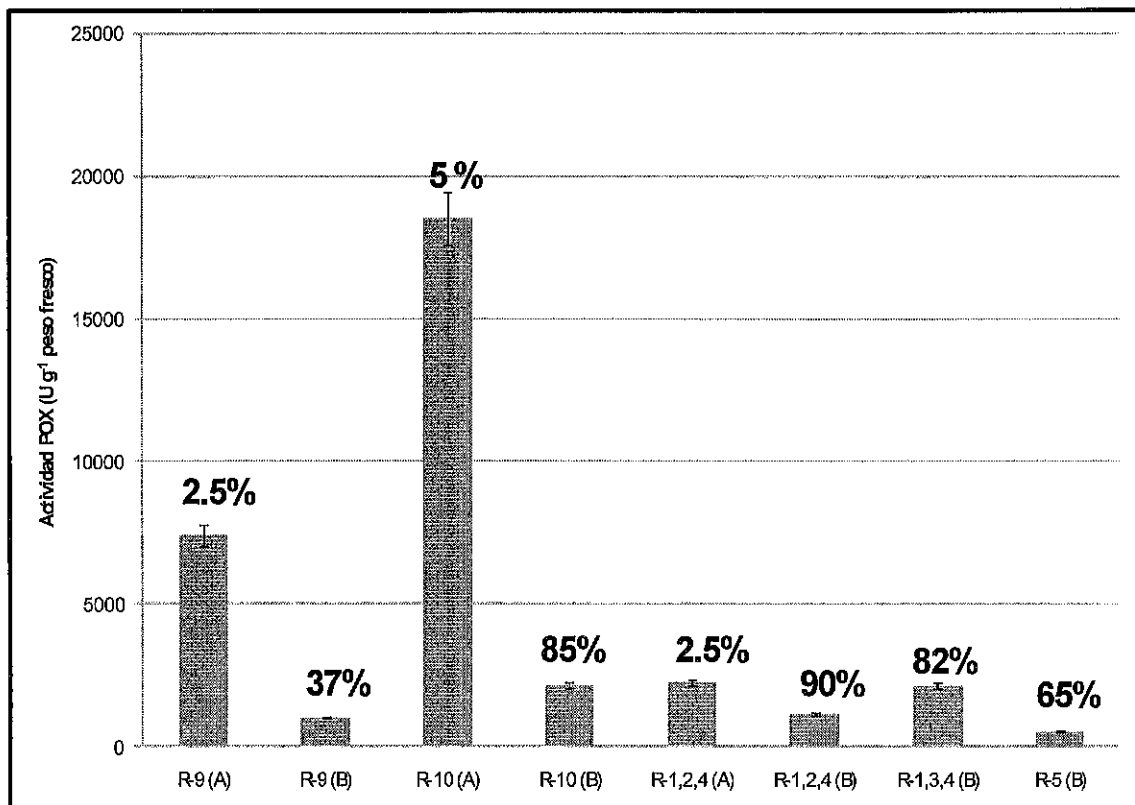


Figura 5. Actividad POX en plantas diferenciales con muestreo A (quinta semana) y B (décima semana) y porcentaje de infección.

4.5. Actividad enzimática SOD

Las diferenciales R-9(A), R-10(A) y R-1,2,4(A), en la quinta semana presentaron un porcentaje de infección bajo. Sin embargo mostraron alta actividad enzimática SOD (Figura 6) como consecuencia del contacto que surgió del elicitor del patógeno con la planta logrando activar el inicio de defensa de la SOD, la cual brinda protección a las

células de la toxicidad del O_2^- y transformarlo en H_2O_2 y la síntesis de las especies de oxígeno actúan directamente contra el patógeno.

Las diferenciales antes mencionadas fueron colectadas y analizadas en la quinta semana (primer muestreo) las cuales presentaron pocos síntomas de necrosis (Apéndice 4). De acuerdo a Camarena (2006), después de la adición del patógeno se presentara la expresión de genes *avr* en la interacción planta-patógeno y la expresión del grupo de genes *Hrp* o genes HR. Por tal motivo el síntoma macroscópico de necrosis, indicó que en las células de la planta ya había ocurrido el estrés oxidativo y tanto SOD y POX se encontraron en actividad para la defensa de la planta.

En comparación con las diferenciales que se colectaron en la semana diez (segundo muestreo), las cuales expresaron baja actividad enzimática debido que la SOD y la POX actúan a nivel membrana y es más notable en las primeras etapas de la interacción del patógeno con la planta.

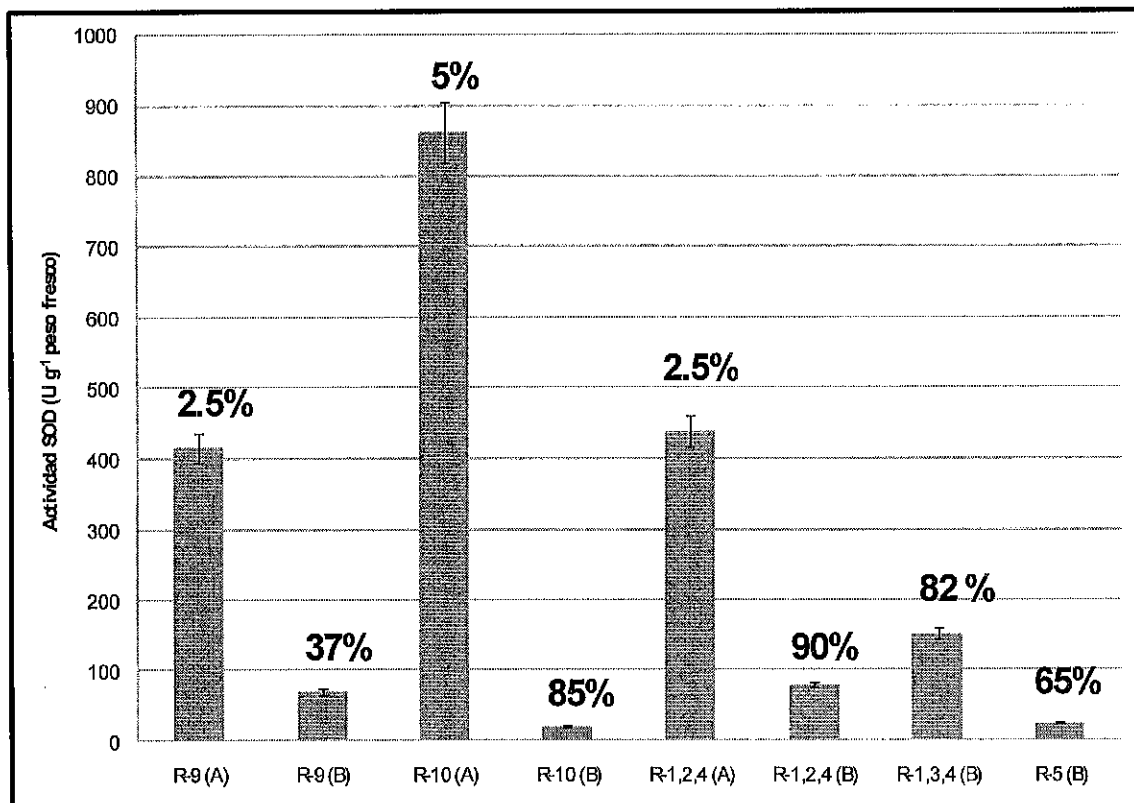


Figura 6. Actividad SOD en plantas diferenciales con muestreo A (quinta semana) y B (décima semana) y porcentaje de infección.

4.6. Análisis de correlación

El nivel de correlación se estimó con una probabilidad de $p = \alpha \leq 0.05$. El valor de la r indica la relación que tiene la variables entres si.

Para el caso de la diferencial R-9 (Cuadro 4) en ambos muestreos los resultados indicaron una relación Infección/Fenoles con un nivel significativo. Comprobando así lo que mencionan Rubio-Covarrubias *et al.* (2006), donde el incremento de fenoles indica que estos están empezando a ser sintetizados durante la infección o ellos están empezando a ser transportados alrededor del tejido. Ahora bien la relación que existe

entre Fenoles/PAL, para el muestreo A, establecido también por un alto nivel significativo, y como lo indican los mismos autores, que la síntesis de *nov*o ha ocurrido y que la actividad de la PAL podría tener un incremento simultáneo o ligeramente por delante de la acumulación observada de fenoles.

Esta misma diferencial también mostró relación Fenoles/SOD, Papadakis *et al* (2001) mencionan que SOD es la primera en la detoxificación del oxígeno, tomando en cuenta que este proceso se lleva a nivel membrana (Figura 1), donde de la misma manera se localizan a los componentes fenólicos, probablemente estén actuando en conjunto para establecer la resistencia a la invasión del patógeno. Otra relación que existe en la planta es la de PAL/POX, para esta relación Azacon y Talon (1993), mencionan que la actividad de la PAL aumenta considerablemente en zonas donde se ha producido la infección, así los genes responsables de la síntesis de esta enzima pueden responder a la presencia de elicitores. Y si bien la POX cataliza la deshidrogenación de sustratos fenólicos y endólicos por H_2O_2 (Djanaguiraman *et al.*, 2004).

Se tiene también que todas las enzimas presentan una alta correlación entre sí, aunque no son significativas. Cuando el patógeno inicia su ataque las enzimas empiezan a detonarse a lo largo del proceso de interacción planta-patógeno.

Cuadro 4. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-9.

	Muestreo	Infección	Fenoles	PAL	POX	SOD
Infección	A	1.00	0.9864 0.0136*	0.9248 0.0752	0.9133 0.0867	0.9465 0.0535
	B	1.00	0.9947 0.0053*	0.8640 0.1360	0.9331 0.0669	0.9253 0.8562
Fenoles	A		1.00	0.9747 0.0153*	0.8713 0.1287	0.9687 0.0313*
	B		1.00	0.8952 0.1048	0.9334 0.0666	0.8890 0.1100
PAL	A			1.00	0.7759 0.2241	0.9567 0.0433*
	B			1.00	0.6940 0.3060	0.6114 0.3886
POX	A				1.00	0.9376 0.2624
	B				1.00	0.9283 0.0717
SOD	A					1.00
	B					1.00

*nivel significativo con $p \leq 0.05$

En la diferencial R-10 (Cuadro 5), no todas las variables presentan correlación y mucho menos nivel significativo para poder establecer que hay relación de variables, exceptuando las del muestreo A, Fenoles/SOD y muestreo B Fenoles/PAL, que presentan el mismo principio explicado anteriormente.

Esta diferencial en el muestreo A, en todos sus análisis presentó alta actividad, (Figuras 3-6) y esto podría explicar que tal vez la raza llegó antes sin provocar de una manera muy evidente (porcentaje de infección) que el patógeno ya estaba establecido por lo tanto todas las reacciones se activaron y al momento del análisis ya todas estaban actuando independientemente y por eso no hay relación entre variables.

Cuadro 5. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-10.

	Muestreo	Infección	Fenoles	PAL	POX	SOD
Infección	A	1.00	0.8720	0.7375	0.3863	0.9462
			0.1280	0.2625	0.6137	0.0538
	B	1.00	-0.0705	-0.3242	-0.5162	0.3100
			0.9295	0.655	0.4838	0.6900
Fenoles	A		1.00	0.8940	-0.1232	0.9835
				0.7993	0.8768	0.0165*
	B		1.00	0.9653	-0.8134	0.8580
				0.0347*	0.1866	0.1420
PAL	A			1.00	-0.4184	0.8641
					0.5816	0.1359
	B			1.00	-0.6333	0.9134
					0.3667	0.8666
POX	A				1.00	-0.2250
						0.7750
	B				1.00	-0.5147
						0.4853
SOD	A					1.00
	B					1.00

*nivel significativo con $p \leq 0.05$

La diferencial R-1,2,4 (Cuadro 6) presenta relación de variables en el muestro A con un nivel significativo aceptable, en Infección/Fenoles, Infección/PAL e Infección/POX. Para este caso se ve claramente que la infección que va ligada con el ataque del patógeno por la característica macroscópica de HR y teniendo como base la Figura 1, que el elicitor del patógeno es el que provoca algunas reacciones de defensa y sobre todo las que se presentan a nivel membrana. Para el muestreo B, solo tiene relación POX/SOD. Esto es por que SOD y POX juegan un importante papel ya que el O_2^- es generado por un numero de rutas NADH/NAPA que es oxidado a NAD/NAD⁺ en presencia de peroxidasa, de la reducción de O_2^- hay una catalización específica en la

membrana por fosforilación de NAD(P)H oxidasa que cataliza la reducción del O₂, con el objetivo de la muerte del patógeno (Mehdy, 1994). Además POX y SOD minimizan la acción toxica de los ROS (Vidhyasekaran, 1997). Las correlaciones de Fenoles/PAL y PAL/POX, ya han sido explicadas anteriormente.

Cuadro 6. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-1,2,4.

	Muestreo	Infección	Fenoles	PAL	POX	SOD
Infección	A	1.00	0.9592	0.9524	0.9528	0.6151
			0.0408*	0.0476*	0.0472*	0.3849
	B	1.00	0.9122	0.9323	0.8881	0.9568
			0.0878	0.0677	0.0119*	0.0432*
Fenoles	A		1.00	0.8580	0.9373	0.4872
				0.1420	0.0627	0.5123
	B		1.00	0.9925	0.9223	0.8806
				0.0075*	0.0777	0.1194
PAL	A			1.00	0.9594	0.9286
					0.0406*	0.1796
	B			1.00	0.8847	0.9286
					0.1153	0.0714
POX	A				1.00	0.7603
						0.2397
	B				1.00	0.7479
						0.2521
SOD	A					1.00
						1.00

*nivel significativo con $p \leq 0.05$

Para la diferencial R-1,3,4 (Cuadro 7) solo se hicieron análisis para el muestreo B dado que el muestreo A no se pudo realizar por que la planta no produjo suficiente follaje esa fecha.

A pesar de que solo se tienen datos del último muestreo, la diferencial mostró todavía proyecto una fuerte relación y nivel significativo de las enzimas que se presentan a nivel membrana y la acumulación de Fenoles que como se ha mencionado son los que evitan el avance de la infección del patógeno.

Cuadro 7. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-1,3,4.

	Muestreo	Infección	Fenoles	PAL	POX	SOD
Infección	B	1.00	0.9988 0.0012*	-0.1373 0.8627	0.9629 0.0187*	0.9726 0.0274*
Fenoles	B		1.00	-0.0960 0.9040	0.9810 0.0001*	0.9649 0.0351
PAL	B			1.00	0.0191 0.9809	0.1454 0.8546
POX	B				1.00	0.9885 0.0115*
SOD	B					1.00

*nivel significativo con $p \leq 0.05$

La diferencial R-5 presentó un comportamiento muy peculiar porque a pesar que solo se logró obtener follaje del muestreo B y de acuerdo al Cuadro 8 solo presentaron evidencias de correlación con un nivel significativo aceptado en Infección/SOD y Fenoles/SOD.

Cuadro 8. Coeficientes de correlación y nivel significativo entre las variables para la diferencial R-5.

	Muestreo	Infección	Fenoles	PAL	POX	SOD
Infección	A	1.00	0.8956	0.0663	0.8453	0.9950
			0.0536	0.7426	0.1547	0.0050*
Fenoles	A		1.00	0.0682	0.7846	0.9714
				0.7389	0.2154	0.0286*
PAL	A			1.00	-0.2984	0.2243
					0.7016	0.7757
POX	A				1.00	0.8570
						0.1430
SOD	A					1.00

*nivel significativo con $p \leq 0.05$

5. CONCLUSIONES

Se identificaron todas las razas fisiológicas descritas por Black (1953). Su llegada cronológica fue casi simultáneamente (excepto R-2,3,4), sin presentar una secuencia específica en cuanto a su complejidad. Las diferenciales R-5 y R-9 presento no más del 80% de infección al final del ciclo.

Se detecto mayor actividad de la PAL, POX y SOD así como una mayor cuantificación de fenoles totales en las primeras etapas del establecimiento de *Phytophthora infestans*.

6. BIBLIOGRAFIA

Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. Limusa. México. 838 p.

Alia-Tejacal, I.; M.T. Colinas-León; M.T. Martínez-Deminan 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 postcosecha. Revista Chapingo Serie Horticultura 8:263-271.

Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1990. Official methods of Analysis. Ed 15th. Published by the Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D.C. 141 p.

Azcon, B.J. and M. Talon. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana Mc.Graw-Hill. pp: 237-2250.

Basha, S.A.; B.K. Sarma; D.P. Singh; K. Annapurna and U.P. Singh. 2006. Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase and phenolic coumpounds differentially in Chickpea. Folia Microbiol. 51:463-468.

Bell, J.N.; T.B. Ryder; V.P.M. Wingate; J.A. Bailey and Ch.J. Lamb. 1986. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and an incompatible plant-pathogen interaction. Molecular and Cellular Biology. 6:1615-1623.

- Beyer, W.F. and I. Fridovich.** 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 556-566.
- Bidwell, R.G.S.** 1979. Fisiología vegetal. Segunda edición. AGT EDITOR, S.A. México. pp:255, 260.
- Black, W.; C. Mastenbroek; W.R. Mills and L.C. Petersen.** 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica.* 2:173-178.
- Buell, C.R.** 1999. Genes involved in plant-pathogen interactions. In: Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture. A. A. Agrawal, S. Tuzun and E. Bent (eds). ASPS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp: 74-75.
- Calderoni, A.V.** 1978. Enfermedades de papa y su control. Ed. Hemisferio Sur Argetina. pp: 19.
- Camarena, G.G.** 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo. Serie de Ciencias Forestales y del Ambiente.* 12:25-30.
- Constabel, C.P.** 1999. A survey of herbivore-inducible defensive proteins and photochemicals. Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture. Agrawal, A.A., S. Tuzun and Bent,

(eds). APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp: 150-153.

Cornide M.T.; H. Lima y A. Sigorra. 1985. Genética Vegetal y Fitomejoramiento. Ed. Científico-técnica. Ciudad de la habana. pp: 411-414.

Davletova, S.; L. Rizhsky; H. Liang; Z. Shengqiang; D.J. Oliver; J. Coutu; V. Shulalaev; K. Schlauch and R. Mittler. 2004. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. The Plant Cell. 17:268-281.

del Rio, L.A.; L.M. Sandalio; D.A. Altomare and B.A. Zilinskas. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. Journal Experimental Botany. 54:923-933.

Desender, S.; D. Adrion and F. Val. 2007. Activation of defense reactions in Solanaceas: where is the specific?. Cellular microbiology. 9: 2-30.

Djanaguiraman, M.; D.D. Devi; J.A. Sheeba; U. Bangarusamy and R.Ch. Babu. 2004. Effect of oxidative stress on abscission of tomato fruits and its regulation by nitrophenols. Tropical Agriculture Research. 16:25-36.

Elliott, G.H. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. In: *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcial and P.H Tsao, (eds). APS PRESS. The American Phythological Society. United States of America. pp: 75.

- Flurkey, W.H and J.J. Jen.** 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. J. of Food Sci. 43: 1828:1831.
- Franzen, J.** 2000. Resistance in populations. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Slusarenko, A. J., R.S.S. Fraser and L.C van Loon (eds). Kluwer Academic Publishers. United States of America. pp: 161-229.
- Fritzermeier, 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 or avirulent races of *Phytophthora infestans*. Plant Physiology. 85: 34-41.
- Gallegly, E.M.** 1991. Genetics of Pathogenicity of *Phytophthora infestans*: The Cause of Potato. In: Advances in Plant Pathology. Volume 7. D.S. Ingram and P.H. Williams (eds). Academic Press, London. pp: 375-393.
- Gees S.R. and H.R. Holh.,** 1988. Cytological comparison of specific (Ra) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. Phytopathology. 78: 350-357
- Goodman, N.R.; Z. Kirán and K.R. Wood.** 1986. The biochemistry and physiology of the plant disease. University of Missouri Press. Columbia. 268 p.
- Grainger, J.** 1956. Host nutrition and attack by fungal parasites. Phytopath. 46: 455-456.
- Grünwald, N.J.; W.G. Flier; A.K. Sturbaum; S.E. Garay; T.B.M. van de Bosch; C.D. Smart; J.M. Matuszak; S.H. Lozoya; L.J. Turkensteen and W.E. Fry.**

2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central. Phytopathology. 91:882-890.
- Grünwald, N.J. and Flier W.G.** 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Annu. Rev. Phytopathol. 43:171-90.
- Gupta, A.S.; J.L. Heinen; J.J. Holaday and R.D. Allen.** 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn peroxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:1629-1633.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jones.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. The Plan Cell. 8:1773-1791.
- Henfling, J.W.** 1987. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Segunda edición. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú (Boletín de Información Técnica No. 4). 25 p.
- Hooker, W.J.** 1980. Compendium of potato diseases. The American Phytopathological Society St. Paul, Minesota, E. U. A. pp: 57-60.
- Huang, A. H.C.; R.N. Trelease and Jr, T.S. Moore.** 1983. Plant Peroxisomes. Ed. Academic Press. New York London. pp: 151.
- Huerta, M. E.** 1977. Aparición cronológica de la razas fisiológicas de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary causante del tizón tardío de la papa y del tomate. Tesis profesional. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencia Biológicas. México, D.F. pp: 65

- Jaramillo, S. y D.A. Rojas.** 1997. Aspectos bioquímicos de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) al ataque del hongo *Phytophthora infestans*. Revista Papa. Colombia. 3: 12-20.
- Jones, D.H.** 1984. Phenilalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry* 23:1349-1359.
- Kähkönen, M.P.; A. I. Hopia, H.J. Vourela; J.P. Rauha; K. Pihlaja; T.S. Kujala and M. Heinonen.** 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- Kamoun, S. Huitema, E. and Vleeshouwers, G.A.A.V.** 1999. Resistance to oomycetes: A general role for the Hypersensitive response?. *Elsevier Science.* 4(5):1360-1385.
- Khan, A.S. and N.Y. Chaudhry.** 2006. Peroxidase activity (POX) in some cucurbit under the stress of mercury and lead. *Journal of Food, Agriculture & Environment.* 4:274-276.
- Malcolmson, J.F.** 1969. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain. *Transactions of the British Mycological Society* 53: 417-423.
- Manfrim, T.D.C.** 2002. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* collected in Florida in 1999 and 2001. Thesis Degree of Master of Science. University of Florida. pp: 105.

- Martinez-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.
- Mehdy, M.C.** 1994. Active oxygen species in plant defense against Pathogens. *Plant Physiol.* 105:467-472.
- Mills, W.R. and J.S. Niederhauser.** 1953. Observations on races of *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology.* 43 (8): 454-455.
- Mittler, R.** 2004. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Müller, K.O and H. Böger.** 1940. Experimentell untersuchungen über die phytophthora-resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Lan Forstwirth.* Berlin-Dahlem. 23:189-231.
- Odjakova, M. and C. Hadjiivanova.** 2001. The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg. J. Plant Physiology.* 27: 101-109.
- Ohl, S.; S.A. Hendrick; J. Chory and Ch.J. Lamb.** 1990. Functional properties of a Phenylalanine Ammonia-Lyase promoter from Arabidopsis. *The Plant Cell.* 2:837-848

- Papadakis, A.K.; C.I. Siminis and K.A. Rubelakis-Agelakis.** 2001. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology*. 126:434-444.
- Pedras, M.S.C., P.B. Chumala and M. Suchy.** 2003. Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry*. 64:949-956.
- Platt, H.W.** 1992. Potato late blight. In: *Plant Disease of International Importance*. Volume II. H.S Chaube, J. kumar, A.N Mukhopadhyay, and U.S Sing (eds). Prentice Hall. New Hersey. pp: 93-123.
- Radwan, O.; S. Mouzeryar; J.S. Venisse, P. Nicolas and M.F. Bouzidi.** 2005. Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive responses within the hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*. 56:2683-2693.
- Ribeiro, O.K.** 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. *Phytophthora. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcial and P.H. Tsao (eds). APS PRESS. The American Phythopatological Society. pp: 55-60.
- Rich, A.R.** 1983. *Potato Diseases*. Academic Press, INC. New York. pp: 44-55.
- Romero, C.S.** 1993. *Hongos Fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Direccion De Patronato Universitario, A. C. pp: 74-79.

- Roussell, P.; Y. Robert and J.C. Crosnier.** 1999. La patata. Producción, mejora, plagas y enfermedades, utilización. Ediciones Mundi- Prensa. México. pp: 293-297.
- Rubio-Covarrubias; O.A. Douches; D.S. Hammerschmidt; R. daRocha; A. and W.W. Kirk.** 2006. Effect of photoperiod and temperature on resistance against *Phytophthora infestans* in susceptible and resistant potato cultivars: effect on deposition structural phenolic on the cell wall and resistance to penetration. Amer J. of Potato Res. 83:325-334.
- Somssich, I. and K. Hahlbrock.** 1998. Pathogen Response in Plants. A Paradigm of Biological Complexity. Trends Plant Sci. 35:86-90.
- Spielman, L.J.; A. Drenth; L.C. Davidse; L.J. Sujkowski, W. Gu, P.W. Tooley, and W.E. Fry.** 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*?. Plant Pathology. 40:422-430.
- Strack, D.** 1997. Phenolic metabolism. In: Plant Biochemistry. Banner, J y Varner, J.E. (eds). Academic Press. pp: 387-416.
- Thurkensteen, L.J.** 1989. Interaction of R-genes in breeding for resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In: Fungal Diseases of potato. International Potato Center, Lima. pp: 85-96.
- Thurston, H.D.** 1971. Relationship of general resistance: late blight of potato. Phytopatology. 61:620:626.

- Trujillo, L.G.** 2004. Desarrollo de marcadores SCAR y CAPS en un QTL con efecto importante sobre la resistencia al tizón tardío de la papa. Tesis profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima-Peru. pp: 6-10.
- Vera-Estrella, R.; J.V. Higgins and E. Blumwald.** 1994. Plant defense Response to fungal pathogens¹. II.G-protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiol.* 106:97-102.
- Vidhyasekaran, P.** 1988. *Physiology of Disease Resistance in Plants*. Volume 1. CRC. Boca Raton, Florida. pp: 49-83.
- Vidhyasekaran, P.** 1997. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. *Molecular Biology and Host Defense Mechanisms*. Ed. Marcel Dekker , Inc. USA. pp: 236-255, 456-469.
- Walton, J.D.** 1997. Biochemical Plant Pathology. In: *Plant Biochemistry*. Banner, J y Varner, J.E. (eds). Academic Press. pp: 487-502
- Wastie, R.L.** 1991. Breeding for resistance *Phytophthora infestans*: The Cause of Potato. *Advances in Plant Pathology*. Volume 7. D.S. Ingram and P.H. Williams (eds). Academic Press, London. pp: 193-224
- Waterman, P.G. and S. Mole.** 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.

- Yoshioka, H. and N. Duke.** 1994. Rapid accumulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase mRNA and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase mRNA by protein synthesis inhibitors. *Plant Cell Physiology*. 35(8): 1257-1260.
- Yu, I-Ching.; J. Parker and A. Bent.** 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7819-7824.
- Zeier, J.; B. Pink; M.J. Mueller, and S. Berger.** 2004. Light conditions influence specific defense responses in compatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*. 219: 673-683.

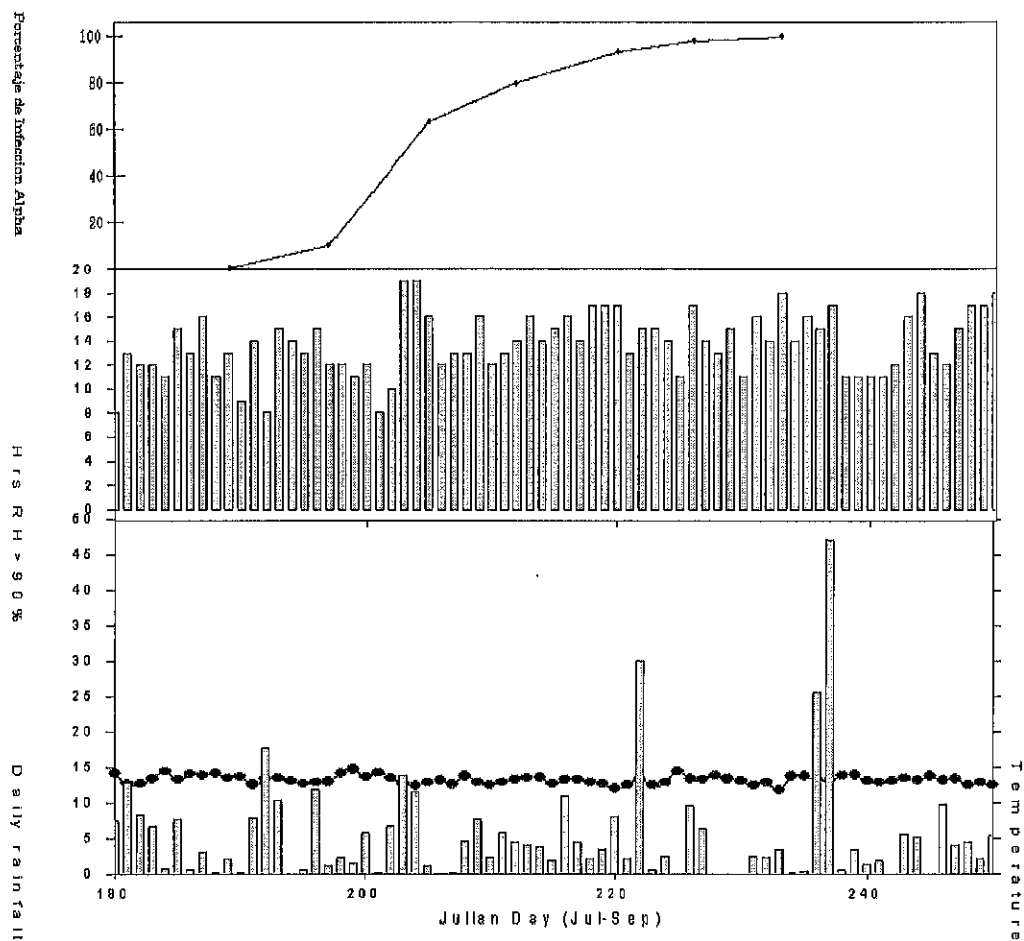
7. APENDICE

Apéndice 1. Clave de campo para evaluar el Tizón Tardío de la papa (Henfling, 1987).

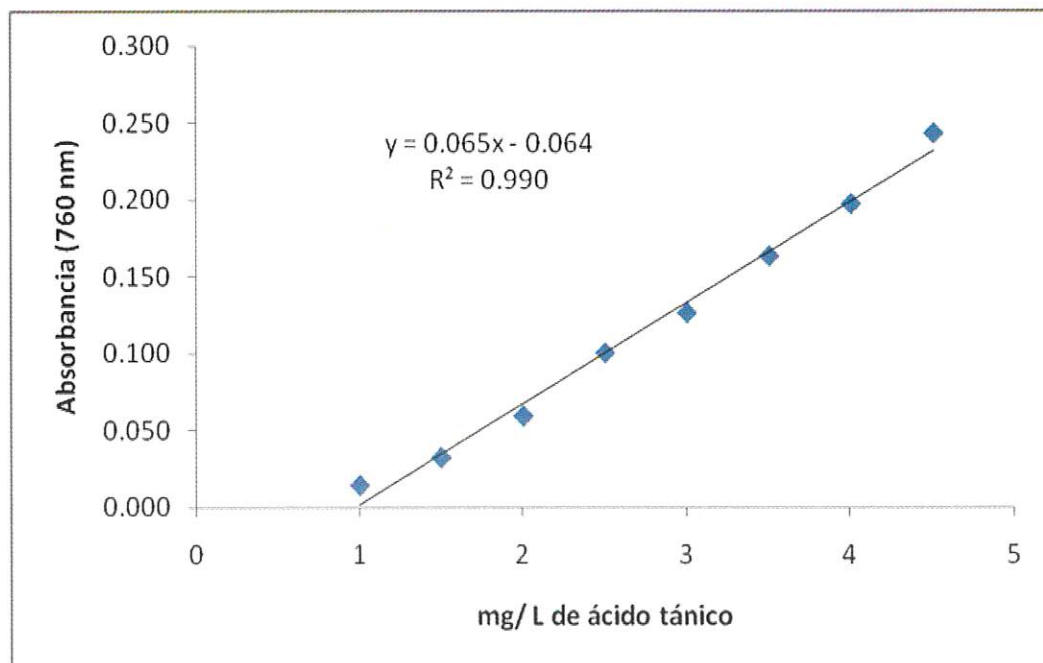
Valores escala del CIP	Tizón (%)		
	Media	Limites	Síntomas
1	0		No se observa tizón tardío
2	2.5	<5	Tizón tardío presente. Máximo 10 lesiones por planta.
3	10	5<15	Las plantas parecen sanas, pero las lesiones son fácilmente vistas al observar de cerca. Máxima área foliar afectada por lesiones o destruida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

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

Apéndice 2. Condiciones meteorológicas dominantes durante el ciclo del cultivo de las razas diferenciales, verano 2006.



Apéndice 3. Curva patrón de la concentración de tánico para la determinación de fenoles totales.



Apéndice 4. Diferenciales a la quinta semana (muestreo A) R-9 No 1, R-10 No 2 y R-1,2,4. No.3. Para esta fecha se presentaron pocos síntomas de necrosis y un bajo porcentaje de infección.

