

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CLONES DE PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) POR INFECCIÓN NATURAL
DE *Phytophthora infestans* Mont. DE BARY**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

ROBLEDO ESQUEDA ERICKA MAGDALENA



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

Chapingo, Estado México, Julio de 2009

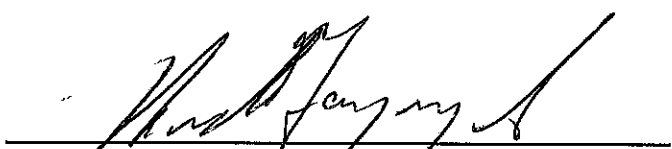


ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) POR INFECCIÓN NATURAL DE *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY.

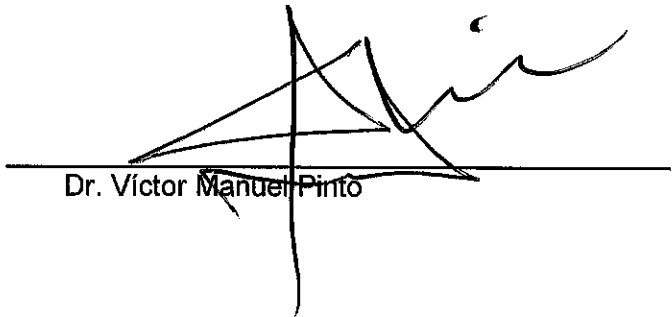
Tesis realizada por Ericka Magdalena Robledo Esqueda, bajo la dirección del Dr. Héctor Lozoya Saldaña y aprobada por el Comité Asesor Indicado, y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

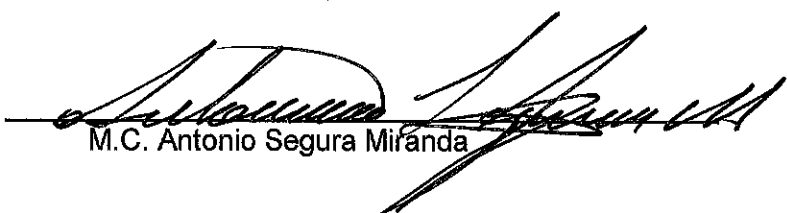
DIRECTOR:


Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR:


Dr. Víctor Manuel Pinto

ASESOR:


M.C. Antonio Segura Miranda

Chapingo, México, Julio de 2009.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios Jesús por que nunca me abandona

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado el financiamiento para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) por brindarme la oportunidad de estudiar en el programa de Protección Vegetal.

Al programa Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, por complementar mi formación en Fitopatología.

Al Ph. Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su valiosa asesoría y paciencia para llevar acabo la culminación del presente trabajo.

Al Ph Dr. Víctor Manuel Pinto por su gran apoyo durante la maestría y durante la realización de este trabajo.

Al M.C. Antonio Segura Miranda, por su apoyo incondicional, persona con una alta dedicación y compromiso en la formación de profesionistas en fitosanidad.

Al Ingeniero Químico Cecilio Mendoza por sus enseñanzas tiempo y paciencia

A mis queridos padres Martha Esqueda Ortega y José E. Robledo Hernández que siempre están conmigo en el camino.

A mi amado esposo Aldo Sánchez Cova, mi complemento y a mis niños hermosos Sara D. Sánchez Robledo por su gran paciencia, apoyo y amor y a Aldo Erick Sánchez Robledo.

A mis hermanitos Pepe y Sam, y a Tania y a su familia (Felipe y Lucy) quienes siempre comparten alegrías y triunfos conmigo, pero aun más importante, están cuando nadie se queda.

A una gran amiga inseparable, admirable e incansable Martha Nayeli Robledo Esqueda y a su hermosa familia (Oscar y Paulita) por siempre hacer equipo conmigo.

A las Familias Sánchez Cova, Navarrete Arreola, Herrera Cortés y Muñiz Robledo por su siempre apoyo de toda la vida.

A las señoras Leonor Cova, Luz Arreola Bricia Martha Navarrete Arreola, Sara Cortes y al Sr. Manuel Godinez M. porque aunque no tenemos lazos consanguíneos tenemos uno más fuerte y son parte de mi familia y siempre están en mi corazón.

DATOS BIBLIOGRAFICOS DEL AUTOR.

Ericksa Magdalena Robledo Esqueda, nació el 15 de junio de 1980, en la Ciudad de México, egresando en el año 2005, de la carrera de Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, con el proyecto de investigación Aislamiento y Cuantificación y Antagonismo de *Actinomicetos* procedentes de la Reserva de los Tuxtlas Veracruz.

En el desempeño profesional se ha desarrollado como ayudante de investigación en el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados, en el área de Ecología de Suelo. También ha dedicado tiempo en la docencia a nivel medio superior impartiendo la cátedra de Química y Ecología General.

En julio de 2006 ingresó a la maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo, egresando en julio de 2009, con el trabajo de investigación "ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L) POR INFECCIÓN NATURAL DE *Phytophthora infestans* MONT DE BARY.

INDICE GENERAL

1.INTRODUCCION.....	1
2.OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3.HIPOTESIS.....	2
4. REVISION DE LITERATURA	
4.1. Biología y Ecología de <i>P.infestans</i>	3
4.2 Resistencia Sistémica Adquirida.....	6
4.3 Resistencia Inducida.....	8
4.3.1. Resistencia vertical.....	8
4.3.2. Resistencia horizontal.....	10
4.4. Resistencia Bioquímica.....	11
4.5 Fitoalexinas.....	13
4.6 Compuestos fenólicos.....	14
4.7 Actividad Fenilalanina amonio-liasa(EC4.3.1.5 PAL).....	16
4.8 Actividad Superóxido Dismutasa (1.15.1.1 SOD).....	20
4.9.Actividad Peroxídasa (EC.1.11.1.7 POX).....	20
5.MATERIALES Y METODOS.....	23
5.1. Fase de campo.....	23
5.2 Fase de Laboratorio.....	24
5.2.1 Polvo de Acetona.....	24
5.2.2 Determinación de Fenoles Totales.....	24
5.2.3 Curva del Ácido Tánico.....	25
5.2.4 Determinación de la Actividad Enzimática PAL.....	25
5.2.5 Determinación de la Actividad Enzimática POX.....	26
5.2.6 Determinación de la Actividad Enzimática SOD.....	26
5.3 Análisis de resultados.....	27

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Porcentaje de infección.....	28
6.2 Determinación de Fenoles Totales.....	30
6.3 Determinación de la Fenilalanina amonio liasa (PAL).....	31
6.4 Determinación de la Peroxídasa (POX).....	33
6.5 Determinación de la Superóxido dismutasa (SOD).....	34
6.6 Rendimiento de Clones evaluados.....	36
6.7 Análisis de Correlación Enzimática (Evaluación de Familias Resistentes).....	37
6.8 Análisis de Correlación enzimática (Clones susceptibles y muy susceptibles).....	45
7. Discusión General.....	48
8. Conclusión.....	50
Literatura Citada.....	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Selección de material vegetal.....	23
Cuadro 2. Rendimiento de los clones evaluados.....	36
Cuadro 3 Correlaciones significativas, en clones resistentes.....	37
Cuadro 4. Correlación de las variables evaluadas para la familia A03592-83.....	38
Cuadro 5. Correlación enzimática del clon A03593-52.....	39
Cuadro 6. Correlaciones de las variables evaluadas clon A03681-56.....	39
Cuadro 7. Correlación enzimática clon A03894-40.....	40
Cuadro 8. Correlación actividad enzimática clon A03913-52.....	41
Cuadro 9. Correlación enzimática clon A04111-54.....	41
Cuadro 10. Actividad enzimática del clon A041120-42.....	42
Cuadro 11. Correlación de actividad enzimática, clon A05217-40.....	42
Cuadro 12. Correlación de actividad enzimática del clon A05279-49.....	43
Cuadro 13 Correlación actividad enzimática clon A05296-70.....	44
Cuadro 14 Correlación enzimática del clon A05327-40.....	44
Cuadro 15 Correlaciones significativas, en clones susceptibles.....	45
Cuadro 16 Correlaciones significativas, en clones susceptibles.....	46
Cuadro17 Correlación clon A05216-70.....	47
Cuadro 18. Correlación Clon A05245-49.....	47

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1 ciclo biológico de <i>Phytophthora infestans</i>	4
Fig.2 .Ruta de biosíntesis de productos fenilpropanoides derivados de fenilalanina...	17
Fig.3 Curva del Tizón Tardío en papa variedad alfa.....	28
Fig. 4 Aspecto general del lote, con los clones de papa.....	28
Fig.5 Curva de infección en clones seleccionados.....	29
Fig. 6 Actividad Fenoles Totales, clones resistentes.....	31
Fig. 7 Actividad PAL, en clones resistentes.....	32
Fig.8 Actividad POX(A y B) clones resistentes, C (clones susceptibles) D clones muy susceptibles a <i>Phytophthora infestans</i>	34
Fig.9 Actividad SOD en los clones seleccionados.....	35

INDICE DE ANEXOS.

ANEXO I Escala Henfling 1987.....	59
ANEXO II. Curva del Ácido Tánico.....	60
ANEXO III. Condiciones ambientales Valle de Toluca Verano 2007.....	61
ANEXO IV. Correlaciones enzimáticas clones susceptibles y muy susceptibles.....	62

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) POR INFECCIÓN NATURAL DE *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY.

ENZYMATIC ACTIVITY OF CLONES OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) BY NATURAL INFECTION OF *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY.

Ericka Robledo-Esqueda¹ y Hector Lozoya-Saldaña²

Resumen

En algunos clones resistentes de papa a *Phytophthora infestans*, se les ha correlacionado la resistencia con la actividad enzimática del cultivo, durante la infección. Las principales bases bioquímicas, de la resistencia dependen de la biosíntesis y la correlación enzimática. Durante el verano del 2007, en campo se evaluó la resistencia genética a la infección natural de *P. infestans* en 2500 clones, cuantificándose el porcentaje de infección foliar. En el laboratorio se dio seguimiento a algunas reacciones enzimáticas de defensa contra el oomiceto. Los clones de papa presentaron diversos grados de resistencia a *Phytophthora infestans* y no necesariamente los más resistentes fueron los más rendidores, lo cual sugiere que algunos susceptibles con rendimiento aceptable pudieran ser genotipos precoces. Aunque se detectaron correlaciones enzimáticas entre todos los clones evaluados, hubo mayor actividad metabólica correlacionada con los grados de infección final en los materiales resistentes que en los susceptibles y muy susceptibles. Se concluye que el tipo de resistencia fue poligénica, o resistencia horizontal, debido a la naturaleza de *P. infestans* y a la correlación entre las actividades enzimáticas, como respuesta al establecimiento del patógeno

Palabras clave: actividad enzimática, resistencia genética.

Abstract

In some potato clones resistant to *Phytophthora infestans*, the resistance has been correlated with the enzymatic activity of the crop during the infection. The main biochemical bases of resistance depend on the biosynthesis and enzymatic correlations. During the summer of 2007, the genetic resistance to natural infection of *P. infestans* was evaluated in field in 2500 clones, and the percentage of foliar infection was quantified. In the laboratory some key enzymatic reactions of defense against the oomycete were followed up. The potato clones showed different levels of resistance to *Phytophthora infestans*, and not necessarily the most resistant were of the highest yielded. It suggests that some susceptible ones with acceptable yield could be early genotypes. Eventhough enzymatic correlations were detected among all the evaluated clones, there were higher metabolic activity correlated to the levels of the final infection in the resistant materials than in the susceptible and very susceptible ones. It is concluded that the type of resistance was polygenic or horizontal, because of the nature of *P. infestans* and also due to the correlations among the enzymatic activities, as a reaction to the establishment of the pathogen.

Keywords: enzymatic activity genetic resistance

¹ Posgrado en Protección Vegetal Universidad Autónoma Chapingo. Carr. Méx-Texcoco Km.38.5 Chapingo, Edo. De Méx. C.P. 56230 e-mail: robledo_eem2000@hotmail.com

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

1. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) es el quinto cultivo en importancia, después de arroz, trigo, maíz, y frijol; y como cultivo en México, la papa ocupa el lugar 35 por la superficie sembrada; sin embargo en cuanto al valor de la producción ocupa el noveno sitio (Sagarpa, 2008).

La enfermedad de Tizón tardío, que se manifiesta en defoliaciones de la planta y pudriciones de frutos y tubérculos en el campo y almacén, causada por *Phytophthora infestans* Mont de Bary ha sido el principal problema fitosanitario de este cultivo por más de siglo y medio, debido a que es una de las enfermedades más destructivas y puede causar pérdidas del 28-100% dependiendo de la variedad de papa sembrada y de las condiciones ambientales sobre las distintas etapas del ciclo de vida de este patógeno para su establecimiento (Agris, 2007).

En los últimos años se han identificado nuevas variantes de tizón, aún más agresivas y con tolerancia a fungicidas sistémicos convencionales, por lo que a nivel mundial, existe un gasto considerable para su control. Las herramientas biotecnológicas y el mejoramiento genético a través de la obtención de variedades resistentes, es una buena opción para mejorar las condiciones de producción de este cultivo (Llacer, 2000).

En algunos clones de papa resistentes, a *Phytophthora infestans*, se ha correlacionado la resistencia con la actividad enzimática del cultivo, durante la infección. Las principales bases bioquímicas de la resistencia dependen de la biosíntesis de muchas enzimas, entre las que destacan la actividad de la enzima fenilalanina amonio-lyase (PAL), actividad de la enzima peroxidasa (POX), actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD) y actividad de fenoles totales (Lozoya et al., 2007).

Otro mecanismo de defensa, que han desarrollado las plantas, es la utilización y modificación del oxígeno molecular, para convertirlo en derivados con alto grado de toxicidad contra microorganismos potencialmente patógenos, la enzima superóxido dismutasa (SOD), regula este mecanismo (García y Pérez, 2003).

Desde hace 60 años, el Valle de Toluca, ha sido considerado como el centro de mayor diversidad genética del oomíeto, debido a que se puede encontrar la fase sexual y asexual del ciclo de vida de *P. infestans*, por lo que es un sitio ideal para comprobar

estudios de resistencia genética en plantas de *Solanum tuberosum* (Lozoya et al., 2006).

Como complemento, dichos estudios se pueden acompañar con evaluaciones de la relación de la actividad enzimática, y la resistencia genética durante la infección natural, en el valle de Toluca por *P. infestans* sobre clones de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Por lo anterior se consideraron los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Evaluar el grado de resistencia y susceptibilidad a la infección natural por *Phytophthora infestans* en clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) y su relación con reacciones de defensa.

2.2 Objetivos específicos.

Evaluar la resistencia genética de clones de papa contra el Tizón Tardío y su relación con el rendimiento de tubérculo.

Cuantificar la actividad enzimática de los clones de papa y correlacionarla actividad enzimática con su resistencia a *P. infestans*.

3. HIPÓTESIS.

Los clones seleccionados de *Solanum tuberosum*, son genéticamente resistentes a la infección de *Phytophthora infestans*.

A mayor actividad enzimática de los clones, mayor será la resistencia genética contra *Phytophthora infestans*.

4. REVISION DE LITERATURA.

4.1 Biología y Ecología de *Phytophthora infestans*.

Phytophthora significa destructor de plantas; *infestans* se refiere al agente causante del tizon tardío, que afecta a la papa, la planta de tomate y otras especies de la familia de las solanáceas (Agrios 2007). La enfermedad se presenta en todas las regiones donde se cultiva papa, es mucho más agresiva en el noroeste de Europa y en la mitad oriental de Norteamérica. La enfermedad destruye follaje y tallos de la papa o de tomate. Cuando se establece el patógeno, el primer síntoma se observa en el borde o puntas de las hojas, y son manchas húmedas circulares o irregulares que se extienden hasta formar zonas café y atizadas las cuales presentan bordes irregulares, en el envés de las hojas se forma una zona blanca constituida por hifas del hongo, la cual presenta una anchura de 3 a 5 mm. Si las condiciones climáticas son favorables y la humedad relativa es del 100% todos los órganos tiernos y aéreos de las plantas se marchitan y se pudren con gran rapidez. En los tubérculos, que son infectados se forman manchas irregulares, negras o púrpuras, que se extienden en la pulpa, estas zonas adquieren después una firmeza se secan y se reabsorben en un cierto grado, estos tubérculos posteriormente pueden ser invadidos por otros hongos y bacterias generando pudriciones blandas (Smart et al., 2000).

Ciclo de la enfermedad.

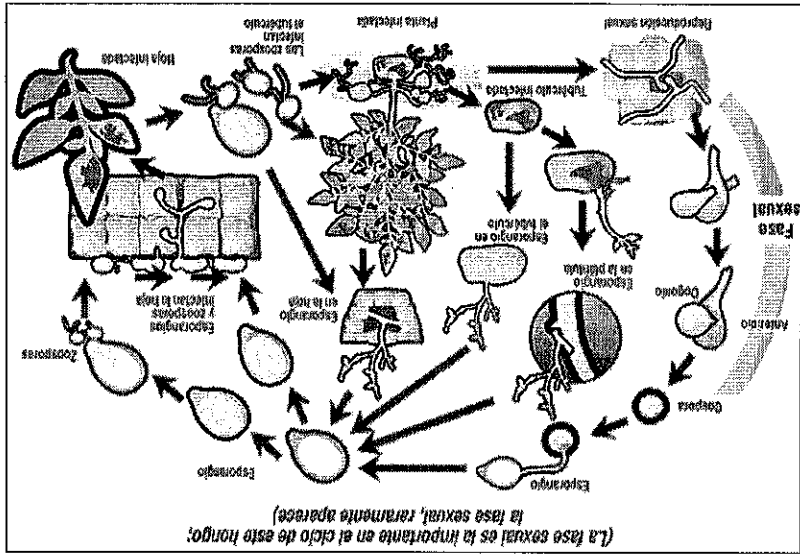
P. infestans, inverna en forma de micelio en los tubérculos de papa, este micelio se propaga hacia el tallo de las plantas con mayor rapidez a nivel de la región cortical, el micelio crece a través del tallo. En las hojas se producen esporangióforos los cuales emergen por los estomas sobre estos se forman esporangios y se desprenden muy fácilmente por la acción de la lluvia o el viento. La germinación de los esporangios sólo se produce cuando hay rocío o un cierto volumen de agua sobre las hojas de las plantas y la temperatura del ambiente es de 10 a 15°C

Y dura aproximadamente dos horas.

En nuevas hojas de papa, donde llegan los esporangios, se desarrolla el tubo germinal, siempre y cuando la temperatura sea de 15 a 25°C, el tubo penetra la cutícula y formando micelio el cual se desarrolla y genera haustorios enrollados hacia el interior de las hojas.

esporangios se encuentran germinando (Agris 2007). Citológicamente, el género *Phytophthora* se diferencia por la morfología de las crestas mitocondriales y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosas con una matriz de β -1-3 glucano en lugar de quitina, además que las vías metabólicas son diferentes como resultado de un sistema genético único (Griffith et al., 1998).

Phytophthora infestans, se reproduce de dos maneras: asexual y sexual (figura 1). La reproducción sexual, ocurre si existe un par de tipos de compatibilidad A1 y A2, esto solo se observa en México y en áreas de Centro y Sudamérica. La reproducción sexual sirve para proporcionar un estado de supervivencia de las oosporas y generar nuevas combinaciones de genes, característica importante en el patosistema *Phytophthora infestans* – *Solanum tuberosum* (Agris, 2007).



En el caso de la reproducción sexual es oogámica. El gameto femenino oogonio es fecundado por el gameto masculino que es el anteridio, el cual es notablemente más pequeño.

Phytophthora infestans tiene un anteridio de tipo anfigeno lo cual indica que el oogonio crece sobre el anteridio.

Como resultado de la reproducción sexual se produce una oospora, de tipo diploide uninucleada y con una gruesa pared celular, la cual puede entrar en estado de reposo y tolerar condiciones de estrés, permaneciendo inactiva o en reposo cuando las condiciones no son favorables para la germinación.

Anterior al desarrollo de los gametos, ocurre la meiosis, es aquí es en donde se observa el único estado haploide del ciclo de vida de *P. infestans* (Jaramillo, 2003).

Medina *et al.*, 1999 trabajaron bajo condiciones de laboratorio para determinar la viabilidad de las oosporas, encontrando que la menor viabilidad fue del 22% a temperatura de 36°C, con una germinación relativamente baja de 6-19%.

Según Juidelson 1999, la determinación del tipo de apareamiento se encuentra controlada por un solo locus, que en condición homocigótica se produce el tipo de apareamiento A2 y A1 en condiciones heterocigóticas, y los cambios climáticos, métodos de cultivo de los hospederos, deriva génica y migración, son factores que posiblemente están determinando los tipos de apareamiento A1 y A2.

Gavino *et al.*, 2000, observaron que bajo condiciones de laboratorio observaron que teniendo los tipos de apareamiento A1 y A2, se pueden obtener oosporas por medio de apomixis, autofertilización y cruce sexual y la patogenicidad es diferente para cada caso. El tipo de apareamiento A2 tiende a la autofertilización

Cuando se tenía oosporas de un proceso de apomixis, la patogenicidad y agresividad eran idénticas a las parentales teniendo una ventaja por la eficiencia biológica sobre las provenientes de autofertilidad o de cruces.

La reproducción asexual genera una zoospora, esta se forma en el esporangio el cual a su vez se desarrolla sobre los esporangióforos estos, tienen un diámetro similar entre sus hifas.

Fraser *et al.*, 1999, mencionaron que una sola lesión en hoja de papa, puede producir hasta 300,000 esporangios por día.

Este tipo de resistencia consiste en una respuesta inmediata de la planta ante el ataque de un patógeno (RH), se caracteriza por la presencia de necrosis en el tejido infectado debido a la respuesta de las células inicialmente atacadas y de las células circundantes. En general, la Respuesta de Hipersensibilidad, incluye un rápido

4.2 Resistencia Sistémica Adquirida.

Con los avances en biología molecular, se han generado técnicas como la determinación de los alelos isoenzimáticos de glucosa-6 fosfato isomerasa (Gpi) enzima mállica (Me) y peptidasa (pe); las cuales proporcionan evidencia genética de la diploidia de *P. infestans* y gracias a ello existen avances entre comparaciones poblacionales para *Phytophthora*.
Otras técnicas como la de la sonda G57 para huella del DNA nuclear y cebadores específicos para la ampliación del DNA mitocondrial, así como RFLPs nuclear y mitocondrial y el análisis Finger printing usando la sonda RG57 PCR específico, que detecta el apareamiento A1, han sido utilizadas para tener información muy precisa sobre la virulencia, agresividad y la posible sensibilidad a fungicidas como el Metaxyl (Abu-el et al., 2003a).

Cuando la zoospora germina o se establece en la cutícula de las hojas se forma un micelio, el micelio de *Phytophthora infestans*, esta compuesto por hifas hialinas, cenocíticas no septadas. El diámetro del micelio es de 5 a 8 micras, las hifas se ramifican en ángulos aproximados de 90°, algunas veces se constriñen en la base (Agrios 2007).
Los esporangióforos se ramifican simpodicamente y el esporangio puede liberar hasta 36 zoosporas; el esporangio tiene una forma limoniforme debido al engrosamiento apical del esporangio, el cual tiene una forma de limón, denominado papila de cuyo extremo emergen zoosporas. Los esporangios, son estructuras hialinas con un tamaño de 18-28mm por 25-35 mm separados por micelio, cada esporangio tiene de 6 a 10 núcleos; germinan casi siempre de forma indirecta por medio de zoosporas a temperaturas menores de 12 o 15°C, por arriba de los 15°C los esporangios germinan directamente produciendo un tubo germinal (Agrios 2007).
Cada zoospora tiene 2 flagelos, después de una hora de movilidad los flagelos se pierden y la zoospora se enquist, desarrollándose una fuerte pared celular. La diferenciación de las zoosporas requiere de la síntesis de proteínas, y la producción del tubo germinal es dependiente de síntesis de RNA (Jaramillo 2003).

incremento oxidativo, flujo iónico caracterizado por intercambio K^+-H^+ , descompartimentalización celular, reforzamiento de la pared celular producción de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular (fitoalexinas) (García y Pérez, 2003).

El hospedero al detectar al patógeno comienza a producir etileno, y se incrementa el ácido 1-aminopropano-1-carboxílico. En las células de la membrana plasmática hay un incremento sobre la permeabilidad y la actividad de los siguientes metabolitos: lipoxigenasa, peroxidasas, polifenoloxidasas, ácido cinámico-4-hidroxilasa, ácido cafeico-O-metiltransferasa y fenilalanina amonio liasa (Llacer, 2000).

El incremento oxidativo de las plantas, es mediado por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el radical hidroxilo ($OH^\cdot$) y el anillo superóxido ($O_2^\cdot$). Se ha demostrado que el H_2O_2 , es una molécula con un efecto microbicida. Este efecto, en la respuesta de hipersensibilidad se observa extensamente en plantas de soya, donde el H_2O_2 induce la expresión de genes de enzimas relacionadas con la defensa como la glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y fenilalanina amonio liasa (PAL). La enzima (GST) también se expresa en procesos detoxificación celular durante estrés oxidativo y la (GPx) regula los niveles de H_2O_2 en el ciclo glutatión ascorbato (Camarena *et al.*, 2007).

Otras alteraciones se producen en la pared celular cuando se expresan las proteínas PRs "proteínas relacionadas con patogénesis" las cuales tienen actividades degradativas y engrosan y bloquean a los plasmodesmos interfiriendo con la comunicación intercelular; estos cambios se encuentran medidos por la acumulación de polímeros como la lignina, callosa, suberina o polímeros de fenoles. La lignina se forma por polimerización y deshidrogenación de precursores producidos en la vía metabólica de fenilpropanoides (Llacer, 2000).

Esta secreción de lignina durante la RSA genera que la pared celular se fortalezca mecánicamente haciéndose más fuerte a la degradación por enzimas secretadas por un patógeno.

En la planta de papa se han identificado ocho tipos de PRs, corresponden a 6 quitinasas β -1,3-glucanasa y amilasa, las cuales son proteínas muy degradativas, también se han observado estas proteínas en procesos de estrés osmótico y tolerancia al frío. Woloshuk (1991), reporto un efecto inhibitorio in vitro sobre *P. infestans* por una PRs llamada taumatina que es una permeasa aislada de la planta de

tomate y tabaco cuyo efecto fue la lisis de esporangios y la inhibición de crecimiento

de *P. infestans*.

Aun no se ha encontrado correlación entre los niveles básicos del RNAm que codifica para una proteína de resistencia y la resistencia a nivel de género pero sí existe una correlación entre resistencia media y las siguientes especies *S. arnezii* x *hondelmannii* *S. microdontum* *S. sucrense* y en variedades de *S. tuberosum* (Jaramillo, 2003).

Los genes que son inducidos en las infecciones primarias por el patógeno, se expresan localmente por lo que son llamados genes de Resistencia Sistémica Adquirida, la identificación de marcadores ligados a la resistencia de *P. infestans* en especies de *Solanum* es de gran valor para el mejoramiento de la papa por resistencia al tizón. Altos niveles de mRNA de los genes que codifican para PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) pueden servir como marcadores moleculares, utilizados para seleccionar las poblaciones en los procesos de mejoramiento y para evaluar el germoplasma (Sha y Kleessing 1996).

4.3 Resistencia Inducida.

Este tipo de resistencia, se genera por la preinoculación con agentes bióticos, químicos o físicos, y es no específica, la resistencia contra un determinado patógeno también puede inducirse cuando se inocula previamente a la planta con una raza incompatible del patógeno, con bacterias o esporas de hongos, muertas con calor. La resistencia inducida se observa inicialmente sobre la zona inicial de infección, después se puede detectar en lugares no inoculados y se manifiesta por lesiones más pequeñas. Para poder observar este tipo de resistencia, debe transcurrir un largo periodo entre el tratamiento de la inducción (primera inoculación) y la inoculación inductora. Durante esta resistencia se ha observado aumento en los niveles de peroxidasas, fitoalexinas, y de lignificación (Agrios, 2007).

4.3.1 Resistencia vertical.

La Resistencia Vertical, también es conocida como Resistencia Monogénica u Oligogénica, se presenta cuando existen genes simples de resistencia en las plantas y también de habilidad parasítica en el patógeno, es decir una relación gen-a-gen.

Esta relación fue descubierta por H. Flor en 1940, demostró que para cada gen de resistencia en el hospedante, hay un gen contraparte en el patógeno, esto se describe como un modelo llave cerradura, cada gen de resistencia en el hospedero tendrá un correspondiente a un perno de una cerradura y cada gen de un patógeno le corresponderá una llave; así el hospedero puede tener varios de estos genes de resistencia o pernos y colectivamente opera como una cerradura biométrica, y el patógeno puede poseer varios de estos genes para operar colectivamente como una llave biométrica.

Cuando el patógeno individual infecta al hospedero individual y su llave biométrica ajusta con la cerradura biométrica, la infección es acoplante y la resistencia vertical ha sido rota, cuando la llave no ajusta la infección es descrita como no acoplante (Robinson, 2008).

En este proceso, la planta tiene la capacidad natural de inhibir el establecimiento inicial del patógeno, debido a que al parecer el hospedante y el patógeno son incompatibles y el hospedante, responde desarrollando una reacción de hipersensibilidad, y gracias a ello el patógeno no se establece ni se multiplica en la planta (Agrios, 2007).

La respuesta de hipersensibilidad comienza por el incremento de proteasas extracelulares ricas en serina, el proceso es regulado por genes (R), que son genes de resistencia dominantes los cuales actúan sobre un elicitador específico de la raza del patógeno generado por un gen de avirulencia Avr.

En *Solanum tuberosum*, los metabolitos que se producen, son el resultado en respuesta a que, el patógeno forma elicitores ácido-grasos insaturados que reaccionan con la lecitina de la papa. Las lecitinas, son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y sirven como receptores en el hospedero que al contacto por infección con los elicitores ácidos grasos del patógeno generan fitoalexinas, las cuales se acumulan en las células vegetales y mueren junto con el patógeno invasor (Estrada, 2000).

Las variedades de papa con resistencia vertical, solo resisten a ciertas razas del patógeno, generalmente cuando son invadidas por *P. infestans*, estas al principio no muestran manchas necróticas profundas y las plantas presentan una apariencia sana, pero de muy poca duración. Según Smart *et al.*, 2000, afirmaron que se han detectado 11 genes de resistencia vertical provenientes de *Solanum demissum*, así como los genes R12 y R13 precedentes de *Solanum berthaultii*.

La resistencia vertical inhibe el desarrollo de epífitas al limitar el inóculo inicial. Sin embargo este tipo de resistencia es temporal, pues solo se construye sobre la base de la población hospedante, por lo tanto si aparece una raza acoplante del parásito la resistencia falla (Agrios, 2007).

El mecanismo de resistencia vertical es muy eficaz, bajo las siguientes características: en cultivos anuales fáciles de reproducir como los de grano pequeño, si se dirige contra patógenos que no se reproducen rápidamente o no mutan con mucha frecuencia, este tipo de resistencia tiene genes fuentes los cuales dan una protección completa a la planta que los porta y el hospedero no es uniforme ni crece en grandes áreas (Robinson, 2008).

4.3.2 Resistencia horizontal.

También conocida como resistencia de campo o resistencia poligénica. Es un mecanismo controlado por múltiples genes, cada gen por separado es ineficaz para contrarrestar el efecto del patógeno. Constituye una especie de seguro contra la variabilidad del patógeno. Es una protección incompleta pero permanente pues no se pierde (Agrios, 2007).

Las características de la resistencia horizontal se expresan por la reducida posibilidad del establecimiento del patógeno por una demora o un inadecuado reconocimiento de los elicitors del patógeno, generando una reducción de la tasa de crecimiento del patógeno en los tejidos huésped y desarrollo de lesiones por infecciones. En este tipo de resistencia la planta activa procesos fisiológicos que funcionan como mecanismos de defensa y el patógeno no tiene la capacidad para soportar todos los cambios fisiológicos del hospedero (Smart *et al.*, 2000).

Existe un gran número de genes que controlan las diversas etapas de los procesos fisiológicos de la planta y que generan las sustancias y estructuras que constituyen sus mecanismos de defensa.

La resistencia horizontal no evita que las plantas sean infectadas, solo retarda el desarrollo de cada uno de los loci de infección en la planta, retrasando el desarrollo de epífitas (Agrios, 2007).

Los genes implicados en esta resistencia son localizados mediante el rastreo de locus segregantes para caracteres y frecuencias cualitativas (QTL); Trabajos de Gebhardt et al., en 2001, demostraron que existen al menos 12 cromosomas en papa generando resistencia poligénica.

Los primeros reportes de resistencia horizontal en papa, se observaron en plantas silvestres, están fueron: *S. stolonifer*, y *S. verrucosum* (Vastie 1991).

Kolovayer en 2002, menciono que en Rusia se realizaron trabajos en plantas de *S. polytrichon*, *S. verrucosum*, *S. pinnatisectum* procedentes de México y *S. simplicifolium*, *S. berthaultii* y *S. gourlay* del Sur de América, con una buena fuente de resistencia horizontal.

La resistencia horizontal existe universalmente en las plantas silvestres y cultivadas; alcanza un punto máximo en plantas silvestres y un mínimo en variedades altamente mejoradas.

En este tipo de resistencia, las plantas se pueden defender contra todas las razas de un patógeno, y se puede perder en ausencia del patógeno pues no hay presión de selección para la resistencia (Agrios, 2007).

Ya que la resistencia horizontal, posee variabilidad cuantitativa con todos los grados de diferencia entre un mínimo y un máximo, muy posiblemente estos niveles pueden cambiar, por ello es difícil incorporar una nueva variedad pues, para hacerlo el fitomejorador necesita trabajar con poblaciones muy numerosas además que, si las condiciones climáticas son muy diferentes para los cultivos se genera una desventaja, es decir la resistencia horizontal es afectada por las diferencias de las condiciones ambientales.

Otra desventaja de la Resistencia horizontal, es que es difícil de analizar por técnicas mendelianas e incluso por marcadores moleculares, debido a la naturaliza poligénica de la resistencia y la poliploidia y heterocigosis de la papa (Jaramillo, 2003).

4.4 Resistencia Bioquímica.

Las bases bioquímicas para esclarecer el desarrollo del tizón tardío, dependen de la agresividad del patógeno y la capacidad del hospedero para responder la infección, es decir, el tiempo requerido para la síntesis de compuestos bioquímicos inhibitorios al establecimiento y desarrollo de *P. infestans*; estas sustancias son principalmente callosa, lignina, fenoles y glicoproteínas.

El proceso de resistencia comienza con la producción de etileno, seguido de la despolarización de la membrana celular, la activación del flujo de Ca^{2+} , el incremento de enzimas, el aumento de la respiración que afecta el transporte de electrones y el aumento del ciclo de las pentosas fosfato el cual activa la ruta del ácido shiquímico (Cohen 2000).

Los compuestos sintetizados por la ruta del ácido shiquímico, son compuestos simples generalmente fenóles, ácido clorogénico, caféico y cumárico, productos que se asocian a la respuesta de hipersensibilidad y tienen un papel fundamental en la inhibición de la esporulación de *P. infestans*. La ruta del ácido shiquímico genera otras sustancias en las células vegetales como lignina y callosa que se encuentran muy correlacionadas con resistencia a nivel foliar (Agris 2007).

Las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y 4 cumarato ligasa (4CL) son enzimas de control de la ruta biosintética del ácido shiquímico y se han reportado su incremento tras la infección del oomiceto a través del follaje así como en el tubérculo (Corme 1992).

En la respuesta de hipersensibilidad, en la Resistencia Sistémica Adquirida, después del ataque por Fitopatógenos, se sobreexpresa ácido salicílico y ácido benzoico, los cuales generan glucósidos conjugados muy presentes en las lesiones necróticas de los tejidos foliares. El ácido salicílico es sintetizado mediante la biosíntesis de fenilpropanoides. En condiciones normales este, se acumula intracelularmente y se une a la enzima catalasa para su regulación y para proteger a las células vegetales contra el estrés oxidativo (Smith et al., 1998).

Cuando existe una sobreexpresión del ácido salicílico la enzima catalasa se bloquea y hay una acumulación anormal en las células; esta señal activa la síntesis de proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis). Bajo condiciones de laboratorio estas enzimas pueden ser sintetizadas adicionando H_2O_2 en las hojas de las plantas (Sha y Kleesigh 1996).

Las Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), son compuestos proteicos, en la planta de papa son sintetizadas después de la exposición a *P. infestans*. Se acumulan en los espacios intercelulares, son principalmente glucanasas y su función es hidrolizar la pared celular del patógeno (Llacer 2000).

Otra ruta trascendente a nivel bioquímico es la ruta acetato-mevalonato, mejor conocida como ruta de los terpenos (Broks et al., 1991).

Por esta ruta, en papa, se producen los siguientes metabolitos durante la infección de *P. infestans*: α -chalcona β -chalcona, solanina, rishitina, phytuberina, solabevona, ilubimina. Las sustancias de origen terpenico, en sobreexpresión han sido asociadas a la inhibición de las hifas del patógeno, pero no se ha logrado ver este efecto inhibitorio en la esporulación.

Aparentemente este tipo de interacción bioquímica se encuentra regulado por la interacción tipo gen a gen en la resistencia vertical (Jaramillo, 2003).

El calcio tiene importancia fundamental en el mecanismo de resistencia a las enfermedades, ya que forma parte en la integridad de todas las membranas y pared celular, además de tener un papel crítico en la división celular, desarrollo celular y activación de enzimas; se cree que las calmodulinas que son proteínas reguladoras de Ca^{2+} y las polibiquitininas son proteínas implicadas con la resistencia, sin embargo su papel no ha sido esclarecido pues los altos niveles de expresión no implican necesariamente factores de resistencia determinantes (Beltrán 2003).

4.5 Fitalexinas.

Las fitalexinas son un grupo de moléculas de estructura diversa, generalmente lipofílicas, que las plantas producen después de una infección por algún microorganismo. Se generan por las células adyacentes a las células necróticas en respuesta a sustancias que difunden las células dañadas, alrededor del lugar donde se produce la infección, y se acumulan en tejidos resistentes como susceptibles. La base de su toxicidad esta relacionada con la disrupción de membranas. También son descritas como metabolitos secundarios sintetizados a partir de un redireccionamiento de precursores del metabolismo primario, en función de la expresión de *novos* genes correspondientes a enzimas que participan en las rutas biosintéticas (García y Pérez 2003)

Las más estudiadas son la faseolina y la clevitona en el frijol, la pisatina en el chicharo, la glicеоlina en la soya, alfalfa y trébol, la rishitina en papa, el gossipol en algodón y el capsidio, en el chile (Agrios 2007). Cuando una o más fitalexinas alcanzan una concentración que inhibe el desarrollo de un patógeno, se genera la resistencia. Los mecanismos por los cuales las fitalexinas llevan a cabo su efecto tóxico aún no esta bien definido, Kuc *et al.*, 1995 propusieron que de las células de la periferia a las células necróticas, se liberaban los inductores endógenos que estimulan la síntesis de fitalexinas y quizá otras reacciones de defensa en las células que los rodean.

La mayoría se generan bajo infecciones de hongos fitopatógenos sin embargo también se han observado en infección de bacterias, virus y nematodos. Ejemplos en nematodos son la producción de gliceoлина, risitina y lubina inducidas por *Meloidogynе incognita* *Heterodera glycines* y *Ditylenchus destructor* en plantas resistentes de soya (*Glycine max*), tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), respectivamente, en comparación con plantas susceptibles, donde la síntesis de fitoalexinas fue muy baja (Vargas 1998).

Un inductor (elictor) es una sustancia que generalmente proviene del patógeno la cual genera la síntesis de fitoalexinas en plantas, son de alto peso molecular y forman parte de la pared celular del patógeno su naturaleza bioquímica es diversa como glucanos, quitosano, algunas glucoproteínas, ácidos grasos y polisacáridos (Hammerchmidt 1999).

Aunque se piensa que la mayoría de los inductores de fitoalexinas se originan en el patógeno, algunas de estas sustancias pueden ser originadas por células vegetales en respuesta a la infección, estrés y contaminantes (García y Pérez 2003).

Según Hammerchmidt 1999, la mayoría de las fitoalexinas identificadas, derivan de la ruta biosintética de los fenilpropanoides y las enzimas que catalizan esta ruta bioquímica son la fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato-4 hidrolasa y 4 cumarato coenzima A ligasa (4CL) y charcona sintasa (CHS), que controlan pasos importantes en las sub-rutas de síntesis. Comúnmente cada una de estas enzimas es codificada por una familia de genes, en las que se ha demostrado que la estimulación ó la infección de células, induce a la vez la expresión de varios genes de la misma enzima.

Glazebrook 2005, observo una correlación de la PAL y el estilbeno, que es una fitoalexina, en los cultivos de uva (*Vitis vinifera*), cacahuate (*Arachis hypogaea*) y pino (*Pinus silvestres*) bajo infecciones por hongos.

4.6 Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos, constituyen uno de los grupos más numerosos de metabolitos de las plantas y desempeñan diversas e importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de los vegetales; los fenóles se acumulan en las capas más superficiales de los vegetales y captan hasta 90% de las radiaciones UV; impidiendo los efectos nocivos por radiación en los tejidos internos de las plantas también, están implicados en respuestas de la planta ante situaciones de estrés hídrico, frío,

respuestas por contaminación, e infecciones por patógenos. Constituyen un grupo heterogéneo de productos con más de 1000 compuestos, pues la diversidad estructural tiene una gran variedad de modificaciones en regiones específicas que incluyen hidroxilaciones, glicosilaciones, acilaciones, sulfaciones y metilaciones (Dixon 2001).

Son también conocidos como fenoles o polifenoles, involucran un amplio rango de sustancias en las plantas las cuales poseen en común un anillo aromático, con uno o más sustituyentes hidroxilos. Los compuestos fenólicos generalmente son solubles en agua, algunos otros son solubles en solventes orgánicos, y otros son polímeros muy grandes e insolubles dentro de la célula se encuentran en las vacuolas, los flavonoides forman el grupo más grande, son precursores de los pigmentos típicos de las flores; seguido por fenoles monocíclicos fenilpropanoides los cuales tienen un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos como el ácido transcínámico, ácido p-cumárico y el ácido caféico; otros fenoles son las quinonas fenólicas, y fenoles complejos como la lignina y suberina (Boudet 2000).

La biosíntesis de los compuestos fenólicos involucra dos vías básicas la del ácido shiquímico y la vía del ácido malónico o de los poliacetatos. La ruta del ácido shiquímico, es dependiente de luz y se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos La eritrosa 4-fosfato con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones, se obtiene el ácido shiquímico del cual derivan directamente algunos fenoles la incorporación de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, conduce a la formación de fenilalanina y por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), se convierte en ácido trans-cínámico sustrato común de la biosíntesis de los fenilpropanoides, flavonoides, fitoalexinas y ligninas. La ruta del ácido masónico, genera la síntesis de quinonas.

Las quinonas son compuestos fenólicos, son abundantes en las células vegetales y en algunos hongos y bacterias. Se clasifican en benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas. La oxidación de productos de los fenoles como las quinonas, generan sustancias altamente tóxicas para el patógeno que se establece por infección en los tejidos vegetales (Dixon y Pavia 1995).

Algunos estudios sugieren que fenoles de bajo peso molecular, como derivados de ácidos benzoicos, y fenilpropanoides, son formados en la respuesta inicial a la infección, y que ciertos compuestos fenólicos de naturaleza muy tóxica se producen e

incrementan a un ritmo acelerado en una variedad resistente que en una susceptible después de haberse producido una infección (Ilacer G. 2000).

Desde 1982 Hammersmith *et al.*, reportaron la relación de dos fenilpropanoides con las fitoalexinas, el ácido cafeico y el ácido clorogénico, en sus estudios encontraron que los fenoles endógenos en cáscaras de papa y aquellos producidos alrededor de lesiones necróticas fueron importantes en la resistencia contra la roña de la papa generada por *Spongiospora subterranea* y reportaron una correlación positiva entre el contenido del ácido clorogénico y la resistencia; indicaron también que la oxidación de productos de ácido clorogénico y ácido cafeico fueron producidos después de la infección siendo más tóxicos que los originales.

En la pérdida de acumulación de ácido clorogénico en interacciones resistentes, podría también interactuar la acetil coenzimaA donde los esteres fenilpropanoides se sintetizan a otros fenoles más esenciales, durante el establecimiento del patógeno. La producción de lignina y suberina, son esenciales para mantener la integridad estructural de la planta; la lignina se encuentra en la lamina media, en la pared celular de los vasos xilemáticos y en las fibras que brindan resistencia a las plantas, también se encuentran en las paredes celulares de las células epidérmicas y ocasionalmente en la pared de las células hipodérmicas de algunas plantas. La unidad estructural básica de la lignina es un fenilpropano, y los esteres fenilpropanoides encabezan la formación de polímeros de lignina, por condensación oxidativa (Boerjan *et al.*, 2003).

La síntesis de suberina, se asocia al refuerzo de la pared celular que junto con la lignina en los tejidos bloquean la formación de un inoculo secundario. En los tubérculos de papa la suberización evita la infección por *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* y *Fusarium sambucinum* y se encontró que los fenoles de la suberina son importantes en la conformación de la suberina dentro de la primera capa de la célula, proporcionando cierto grado de resistencia (Gogoi *et al.*, 2001).

4.7 Actividad de Fenilalanina amonio liasa EC.4.3.1.5 (PAL).

La fenilalanina amonio liasa (PAL), es una enzima reguladora de la síntesis de los fenilpropanoides (Figura 2); durante esta síntesis se genera una variedad de

compuestos fenólicos; con funciones relacionadas con estructura y defensa; los principales son: pigmentos flavonoides, cumarinas, fitoalexinas, lignina y ésteres fenólicos (Dixon y Pavia 1995).

La actividad PAL, es incrementada por diversos factores como condiciones ambientales, estrés por frío, luminosidad e infecciones por virus bacterias y hongos y depende de la concentración de diferentes hormonas. Durante el curso normal del desarrollo y crecimiento de las plantas, la concentración de PAL, se incrementa o se reduce. Se han reportado niveles altos de la enzima durante la floración, gametogénesis y germinación del polen, y concentraciones bajas durante el crecimiento de los tallos (Hermann 1999).

Desde 1989 Cramer *et al.*, observaron en sus estudios que la PAL, esta codificada por pequeñas familias multigénicas y se expresan diferencialmente en los tejidos de las plantas dependiendo de la respuesta a distintas condiciones por estrés.

Existen diversos genes que se encuentran involucrados en la expresión de la PAL, estos genes son SBF-1, MYB PH3 y PMYB. Se ha señalado la existencia de tres genes que codifican para la enzima PAL en trébol, detectándose hasta 11 isoformas de la enzima, lo que sugiere modificación post-traduccionales, permitiendo diversas actividades catalíticas dependiendo de las situaciones ambientales de la planta y el proceso de infección de algunos patógenos.

Los genes SBF-1, han sido descritos en trébol estos son promotores de la síntesis de la enzima charcona isomerasa (CHS) y han sido implicados como silenciadores o amplificadores dependiendo de las células donde se encuentren (Garay *et al.*, 1991)

En las plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), estos genes han sido promotores de la PAL y la secuencia (box-P) une el Factor BPF-1 en respuesta a estimulación por establecimiento de patógenos, la estimulación resulta en un rápido incremento de transcritos BPF-1 que acompaña la transcripción de PAL. (Gebhardt, 2001).

En infecciones causadas por *Fusarium thapsinum* en tejidos florales de sorgo (*Sorghum bicolor*) se ha observado aumento en los niveles de expresión de la PAL y CHS; la acumulación de ambas enzimas, es resultado de una regulación a través de un mecanismo genético de control en común (Little *et al.*, 2003).

Lo mismo ocurre en infecciones de cítricos por *Penicillium digitatum*, la actividad de la PAL va en aumento ante la infección (Ballester *et al.*, 2006).

Bezier *et al.*, 2002, indicaron que en frutos de uva (*Vitis viticola*) existe un aumento de la PAL y la enzima (estilbeno sintasa), en respuesta a la infección por *B. cinerea*, también observo un incremento en la expresión de los genes tras la inoculación de las hojas con el hongo.

Según Vargas 1998, también observo un incremento de la actividad enzimática de plantas resistentes en comparación con plantas susceptibles bajo la infección de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con *Phytophthora capsici*. El incremento de la PAL, ha sido también estudiado en infecciones por virus y nematodos; en leguminosas el virus del mosaico del tabaco (TMV) indujo el incremento y la actividad de la enzima así como la inducción de fitoalexinas antimicrobianas (Jones 1984).

Durante la infección de los nematodos *Meloidogyne incognita* y *M. javanica* en plantas resistentes de jitomate, ricino cebada, trigo y soja se observo un incremento de la actividad PAL y un efecto directo sobre la síntesis de lignina en raíces de estas plantas.

Por otra parte se ha observado que algunos compuestos fenólicos, son muy tóxicos a nematodos estos son: el ácido transcinámico, pirogalol, ácido hidrobenczoico, ácido ferúlico y ácido caféico (Mahajan *et al.*, 1985).

Cramer *et al.*, 1993, encontraron que, plantas inoculadas con *Meloidogyne Globodera*, producen cambios en la expresión genética, y se observa que en plantas resistentes hay un incremento de la transcripción de genes relacionados con la defensa, y la actividad PAL, y en plantas susceptibles no se observa este efecto. En las leguminosas, se ha observado que el manganeso activa la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, como la tirosina y varios productos secundarios, como la lignina, los flavonoides y el ácido indolacético, este elemento afecta a la fenilalanina amonio liasa (PAL) y estimula a las peroxidasas requeridas en la biosíntesis de lignina (Boerjan *et al.*, 2003).

Se ha observado que la actividad de compuestos fenilpropanoides, tiene variación en los diferentes órganos de la planta, Nagarathna *et al.*, 1993 realizaron estudios para comprobar esto durante la infección de *Sclerotinia graminicola*, en plántulas de maíz

(*Pennisetum glaucum*) sobre raíces, brotes y mesocotilos y observo que hubo más actividad de la PAL en raíces, que en brotes y muy poca actividad en el mesocotilo.

4.8 Actividad Superóxido dismutasa (1.15.1.1SOD).

Durante la interacción hospedero-patógeno, se genera especies reactivas de oxígeno mejor conocidas como (ERO)s. El H_2O_2 , es el producto de la explosión oxidativa el cual restringe el proceso infeccioso invasivo de los patógenos.

La explosión oxidativa, es el resultado de la acumulación del superóxido, el cual es muy estable y de baja toxicidad. El O_2^- puede ser transformado por la superóxido dismutasa (SOD) a H_2O_2 que en concentraciones altas es tóxico, por su permeabilidad en las membranas celulares; además que la producción de peróxido de hidrógeno H_2O_2 se asocia a los diferentes procesos de lignificación, entrecruzamiento de proteínas y compuestos fenólicos y la alteración del estado redox celular que lleva a la activación de genes de protección celular (García *et al.*, 2004).

Hu *et al.*, 2003., observaron que en plantas transgénicas, donde se sobre expresaban enzimas catalizadoras de H_2O_2 , como superóxido dismutasa, había una elevada resistencia a los patógenos.

A nivel celular, la enzima SOD, se encuentra en el citoplasma cloroplasto y principalmente en las mitocondrias de las plantas.

A su vez, esta enzima protege a las células vegetales de la toxicidad del oxígeno, y aun no se estable si tiene relación directa con las catalasas.

La enzima SOD, no es exclusiva de los vegetales, se puede encontrar en procesos fisiológicos y bioquímicos de cualquier organismo vivo, aeróbico.

Las isoformas de la Superóxido dismutasa se pueden clasificar de acuerdo al metal que contienen en su estructura, en los vegetales se encuentran la FeSOD, MnSOD, y CuZnSOD (Camarena 2007).

4.9 Actividad Peroxidasa EC.1.11.1.7 (POX).

Son proteínas, oxido reductasas, detectadas en todas las plantas vasculares, que contienen un grupo prostético hemo y utilizan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para oxidar sustratos; y producen especies reactivas de oxígeno; existen entre 10 y 20 isoformas de esta enzima, las distintas isoenzimas de las peroxidasas, pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes cinámicos; las isoenzimas de peroxidasa tienen un alto grado de polimorfismo, el cual varía de acuerdo al cultivar y el órgano de la planta. Las isoformas difieren tanto en su tamaño como en la secuencia de aminoácidos y por lo tanto en sus propiedades químicas (Roldan *et al.*, 2008).

Controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo celular, inactivan los radicales libres que se generan en múltiples procesos celulares, por ello se pueden detectar desde la germinación hasta la senescencia, contribuyen al control de la fotorespiración, y elimina los peróxidos producidos por la exposición a la luz UV (Lagrimini 1997).

El incremento de su actividad se relaciona con el estrés fisiológico, y en el proceso durante el establecimiento de los patógenos, las peroxidadas se relaciona con oxidación de compuestos fenólicos que generan quinonas, síntesis de lignina en pared celular, síntesis de suberina, regulación de niveles de auxinas, catabolismo oxidativo del ácido indolacético y biosíntesis de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Van de Velde *et al.*, 2001).

Yoshioaka *et al.*, 2003, indicaron que en angiospermas las peroxidadas son codificadas por familias complejas de genes inducibles cat1 y cat2.

Dependiendo de su punto isoelectrico pueden ser peroxidadas ácidas o básicas.

A nivel histológico, se encuentran en los tejidos meristemáticos, epidérmis y tejidos vasculares; en frutos se encuentran en xilema y epidérmis, a nivel celular se localizan dentro de las vacuolas y la pared celular, las básicas se localizan en ambos organelos, mientras que las ácidas solo están en la pared celular y su actividad es mayor pues, las peroxidadas ácidas intervienen en la polimerización de la lignina, y la biosíntesis de la pared celular secundaria mediante la polimerización de alcoholes hidroxil y metoxilaminicos, formando puentes con la celulosa, pectina e hidroxiprolina (Boudet 2000).

Bradley *et al.*, 1992, indicaron también que después de la infección, la enzima POX, fortalece las uniones cruzadas de glicoproteínas en procesos de lignificación en paredes celulares.

Gayoso *et al.*, 2004, indicaron que en la resistencia de plantas de Chile (*C. annuum*) al ataque de *P. capsici*, se vio reflejada en el aumento de compuestos fenólicos y el incremento de la peroxidasa en la raíz de la planta, este aumento de la POX, se observó después de 12 y 48 horas de que se realizó la inoculación, en hojas y tallos el incremento se mantuvo constante después de 12 horas de la inoculación, hasta el quinto día; y los niveles de H_2O_2 fueron constantes durante los primeros días, por lo tanto en este caso la actividad de la peroxidasa no es la principal fuente de especies reactivas del oxígeno.

Otros estudios realizados por Egea et al., 2001, con *P. capsici* en tres cultivares de chile con diferentes niveles de resistencia mencionan que existen variedades de isoenzimas con diversos puntos isoeléctricos en los tres cultivares evaluados y apoyan la idea de que las enzimas peroxidadas pueden utilizarse como marcadores de la resistencia a este patógeno.

La peroxidasa y la polifenoloxidadasa, catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos, a quinonas que suelen ser muy tóxicas, en trabajos realizados en plantas de (*Oriza sativa*) bajo la inducción de *G. moseae*, se encontró que las variedades resistentes tenían más actividad de estas enzimas que en plantas susceptibles (Malthur 1995, Rodríguez et al., 2006)

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Fase de Campo.

La primera fase, del experimento se realizó durante el verano de 2007 en el campo experimental PICTIPAPA, (Programa Internacional Cooperativo de Tizón Tardío de la Papa), en Metepec Valle de Toluca, Estado de México). En esta fase se registro el porcentaje de infección, ocasionada por el *Phytophthora infestans*, en los genotipos incluidos en este estudio.

Se incluyo a la variedad Alfa, como indicadoras de la infección, durante cinco semanas.

Posteriormente, se seleccionaron 25 clones al azar (un individuo por clon para darle seguimiento a las variables del estudio (Cuadro 1).

Clon	Progenitor/Hembra	Progenitor/Macho	No. Mues.
A03592-83	A90586-11	G6582-3	5
A03593-52	A90586-11	P158331	5
A03604-53	A95053-61	A96095-3	4
A03267-55	496764-19	EHA99-4156-1	4
A03681-56	A97066-48LB	AO96781-4	5
A03859-46	NY124	ND4233-1Rus	3
A03871-58	V-15-71	A7961-1	4
A03891-80	Meduza	Ranger Rus	3
A03894-40	Stirling	A97223-9	5
A03904-70	Turn-Over	A95162-1	4
A03913-52	A9689-54	WHA99-4156-1	5
A04111-54	IND1041	A98077-4	5
A04120-42	MX78-199-33	A96095-3	5
A05210-66	A96783109LB	A92030-5	3
A05214-78	A96783-114LB	A93157-6LS	4
A05217-40	A96814-65LB	A97119-2	5
A05237-55	A97066-42LB	LBR-43	4
A05279-49	A00487-22LB	A96104-2	5
A05290-67	A00487-29LB	A93157-6LS	3
A05296-70	A00540-14LB	Westerm R.	5
A05327-40	LBR-40	A99032-2TE	5
A05345-49	Nevsky	A97214-4	4
A05216-70	A96814-65LB	A92030-5	3
A05245-49	A98011-53LB	A99032-2TE	3
A05252-64	A99366-4LB	A93157-6LS	4

Cuadro 1. Selección de material vegetal (el numero de muestreos, se realizo deacuerdo al material vegetal disponible en campo).

5.2 Fase de laboratorio.

El análisis de la presencia de fenoles totales y de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL EC.1.11.1.7), Peroxidasa (POX EC. 1.11.1.7), Superóxido dismutasa (SOD EC 1.15.1.1), se realizaron en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.2.1 Polvo de acetona.

Con el fin de preservar las muestras de la hoja de papa para la actividad enzimática, se realizó el procedimiento de polvo de acetona descrito por Alia-Tejacal et. al., 2002. Durante la recolección de material vegetal, se tomó un aproximado de 30 gr de hoja fresca de papa, en el laboratorio se molieron en una licuadora con 50ml de acetona, al 100% , la cual tenía una temperatura de 4°C, posteriormente se filtró al vacío, separándose un sobrenadante y un polvo de acetona, el procedimiento se repitió 5 veces, hasta obtener un polvo blanquecino, el cual se almacenó a -4°C, hasta el ensayo de las enzimas PAL, POX, y SOD. El sobrenadante también se almacenó a -4°C y se utilizó para el análisis de fenoles totales.

5.2.2 Determinación de Fenoles Totales.

Se determinaron de acuerdo al método descrito por Wateman y Mole (1994).

Se preparó el siguiente ensayo, en tubos de fondo plano, del sobrenadante obtenido de cada muestra, se utilizaron 30µ y se agregó en el siguiente orden, 1 ml de agua desionizada, 1ml de Folin Ciocalteu y 2ml de carbonato de sodio al 20% se agitó, y se dejó reposar por 2hr en oscuridad total; pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm de luz visible en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy). La cuantificación se realizó mediante una curva patrón de ácido tánico (Apéndice II), la concentración de fenoles totales se reportó como miligramos por gramo de peso fresco (mg/g^{-1}).

5.2.3 Curva de Ácido Tánico.

La curva estándar de ácido tánico, se realizó mediante el método descrito en AOAC (1995) (Anexo II).

Se disolvieron 10mg de ácido tánico en agua desionizada, de esta mezcla se tomaron 2ml y nuevamente se aforaron a 100 ml de agua desionizada para obtener una concentración de 20µ/ml. Se tomaron alícuotas de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ml se depositaron en tubos de ensaye de fondo plano, y se les adicionó a cada uno, agua desionizada en este orden 16, 15.5, 15, 14.5, 14, 13.5, 13 y 12.5 ml.

Finalmente se agregó 1 ml de Folin-Ciocalteu y 2ml de solución carbonato de calcio (Na_2CO_3) a cada tubo para tener un volumen total de 20 ml.

Se agito cada tubo vigorosamente, y se dejó reposar en la oscuridad durante 2 hr. Posteriormente se registro la absorbancia a 760 nm, de luz visible en el espectrofotómetro.

5.2.4 Determinación de la Fenilalanina amonio liasa (EC.4.3.1.5 PAL).

La actividad de esta enzima, se determino con el método descrito por Martines- Téllez y Lafuente (1997). Se utilizo 0.1 gr de polvo de acetona homogenizada, durante 50 segundos con 5 ml de Tampón Borato de Sodio 0.1M (pH8.8) frío y 20µl de β-mercaptoetanol (antes del homogenizado, se añadió PVP al 1% al tampón Borato de Sodio). La mezcla se filtro usando embudo de plástico y malla de tela, en seguida se centrifugo a 12,500 Xg a 4°C durante 20 minutos.

El sobrenadante extraído, fue el que se utilizo para continuar con esta técnica, a este se precipitado se le fue agregando 0.46g de sulfato de amonio por cada mililitro de sobrenadante y se agito en un baño con hielo durante 30 minutos. Después se centrifugo nuevamente, durante 20 minutos a 12,500 Xg a 4°C, se conservo el precipitado y se elimino el sobrenadante.

Finalmente el precipitado se redisolvió agregando 4.5 ml de tampón Acetado de amonio 0.1M pH 7.7 (+ 20µl mercaptoetanol esto se agregan justo antes de usarse).

Para el ensayo de la actividad, se prepararon tubos de ensaye de fondo plano donde se hizo la siguiente mezcla, se tomaron 2 ml del extracto enzimático obtenido y 3.4 ml de agua para HPLC y se adicionaron 0.6 mL de L-fenilalanina 60 mM; simultáneamente se prepararon tubos blanco que contenían 2ml de extracto y 4ml de agua para HPLC. Y se midió la absorbancia a 290nm a luz UV, en un espectrofotómetro y después se incubaron por 2 hr durante 30 minutos a 40°C para finalmente medir el cambio de absorbancia. La actividad enzimática se reportó como Ug de peso fresco.

5.2.5 Determinación de la Actividad de peroxidada (EC.1.11.1.7 POX).

La actividad de la POX, se determino, mediante la metodología descrita por Alia-Tejacal *et al.*, 2002, se tomo 0.05g de polvo de acetona y se homogenizo con 5 ml de Tris-HCl frio (pH 7.1), durante 50 segundos, (antes de homogenizar se agrego PVP al 1% a la solución Tris-HCl) y se centrifugo por 20 minutos a 12500 Xg a 4°C. Posteriormente las muestras se dejaron a temperatura ambiente.

El sobrenadante, se utilizo para el ensayo de acuerdo a Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones la mezcla del ensayo fue con un volumen total de 3 ml, de los cuales 2.6 ml eran del amortiguador Tris-HCl pH 7.1, 0.25 ml de guayacol 0.1M, 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 0.25% y 0.05 ml del sobrenadante.

Se evaluó el cambio de absorbancia a los 30,60,120 y 180 segundos en un espectrofotómetro (Spectronic 21D Milton Roy) a 490nm con luz visible. La actividad enzimática se reportó como Ug^{-1} de peso fresco (U es la unidad de actividad enzimática, una unidad es igual a $1mmol\ min^{-1}$ de tetraguayacol).

5.2.6 Determinación de la enzima Superóxido dismutasa (1.15.1.1 SOD).

La actividad enzimática se realizo de acuerdo al método descrito por Beyer y Fridovich (1987), Se tomaron 0.05 g de polvo de acetona con 5 ml de amortiguador fosfato pH 7.8, frio, se homogenizo por 50s con un homogenizador para tejidos vegetales.

La mezcla se centrifugo a 12500 Xg por 20 minutos a 4°C, se dejo que tomaran temperatura ambiente en absoluta oscuridad.

Para el ensayo se utilizaron tubos de rosca, y se agregaron 3ml de solución buffer fosfato + EDTA + metionina +NBT y triton X, con 0.5ml de sobrenadante producto del centrifugado; también se añadieron 0.03 μl de riboflavina y se agito vigorosamente. Simultáneamente se preparo de la misma manera, un tubo blanco el cual no contenía el sobrenadante.

Todos los tubos se llevaron al cuarto oscuro y se iluminaron con lámparas de luz fluorescente durante 7 minutos. Se evaluó el cambio de absorbancia a 560nm. La actividad enzimática se reporto en unidades internacionales por gramo de peso fresco (Ug^{-1} p.f.); cada unidad es igual a la cantidad del sobrenadante que fotoinhibe la formación de 50% de azul de nitro tetrazolium formazan.

5.3 Análisis de resultados.

El análisis estadístico de los resultados, se realizó mediante los programas Excel, para la elaboración de gráficas de comportamiento de la actividad enzimática y fenoles totales y el programa SAS (Statistics versión 8.1), para análisis de correlación enzimática.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Porcentaje de infección.

El establecimiento de *P. infestans*, en campo fue exitoso, las condiciones ambientales fueron las óptimas para el desarrollo del patógeno, que son mínimo 10 hrs/día con humedad relativa superior al 90%, y temperatura entre 10 y 15°C (Anexo III).

El Porcentaje de infección en las plantas variedad alfa, sirvió de referencia para comprobar el establecimiento de la enfermedad (Figura 3).

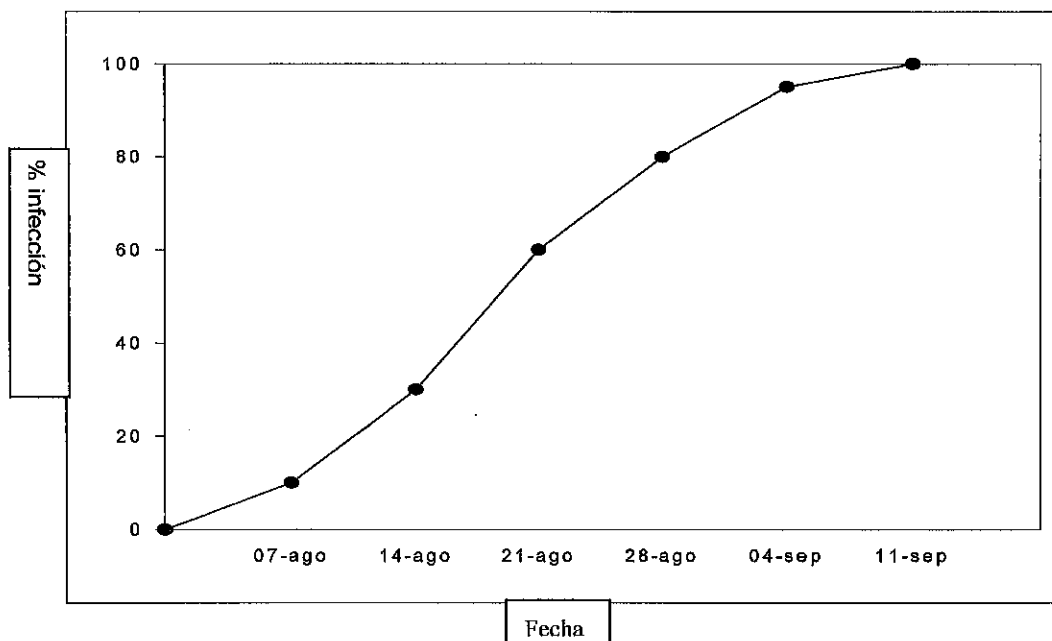


Fig.3 Curva de progreso Tizón Tardío en papa variedad alfa (testigo)

El origen genético de los clones es único, la diversidad en campo fue amplia (Figura 4) y la respuesta ante el ataque de *P. infestans* fue variada (Figura 5).



Fig. 4 Aspecto general del lote, experimental. Toluca Metepec, Méx. 2007.

De los clones evaluados se consideraron resistentes aquellos que tenían hasta un 50% de infección. Durante un lapso de 9 semanas, se realizaron las mediciones de infección según la escala Henfling 1987 (Figura 5).

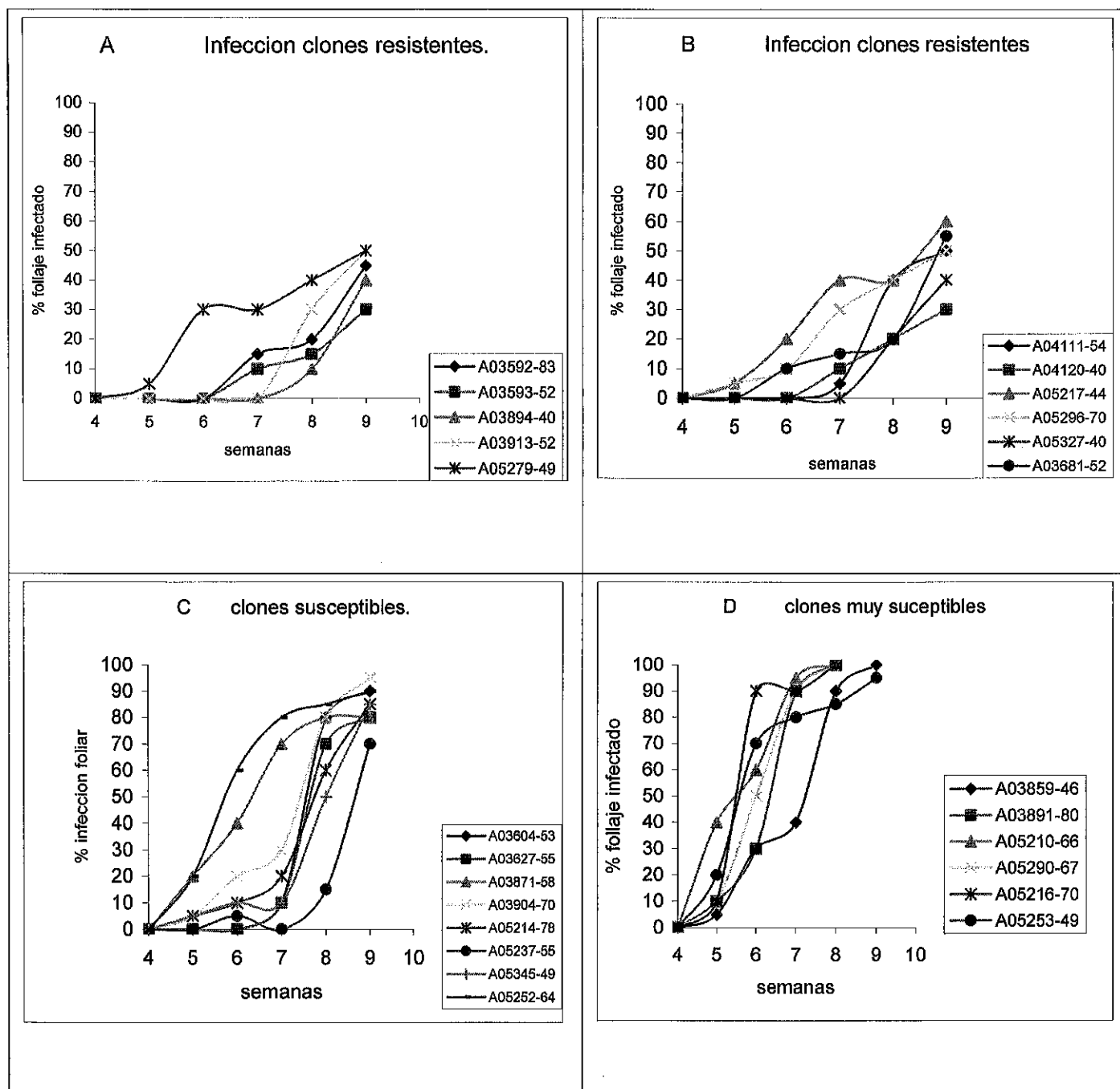


Fig.5 Curva de infección en clones seleccionados.

Durante la semana cuatro del cultivo, aparecieron los primeros síntomas en campo del establecimiento de *P. infestans*, a la siguiente semana se seleccionaron los materiales para evaluarlos en el laboratorio. Cada semana se tomaron muestras de follaje, los clones que permanecieron con alta resistencia fueron aquellos donde se colectaron cinco muestreos y son los siguientes: A03592-83, A03593-52, A03681-56, A03894-40, A03913-52, A04111-54, A04120-42, A05217-40, A05279-49, A05296-70, A05327-40.

6.2 Determinación de Fenoles totales.

Hubo mucha diversidad en la concentración de fenoles totales, entre los clones. En los clones resistentes (Figura 6 A, B).

Se aprecia una diferencia contra los clones muy susceptibles (Figura 6 C,D), en donde la concentración de fenoles totales es muy baja. Muchos compuestos fenólicos inducen la resistencia, mediante el efecto inhibitorio sobre las enzimas que el patógeno produce al iniciar el establecimiento de la infección, se han reportado estudios de plantas resistentes, con altos contenidos de fenoles totales, los fenoles también estimulan la síntesis de fitoalexinas, y se producen y acumulan *de novo* por estímulos externos a un ritmo mayor en variedades resistentes que en las susceptibles (Arora y Wagle 1985; Basham 1986).

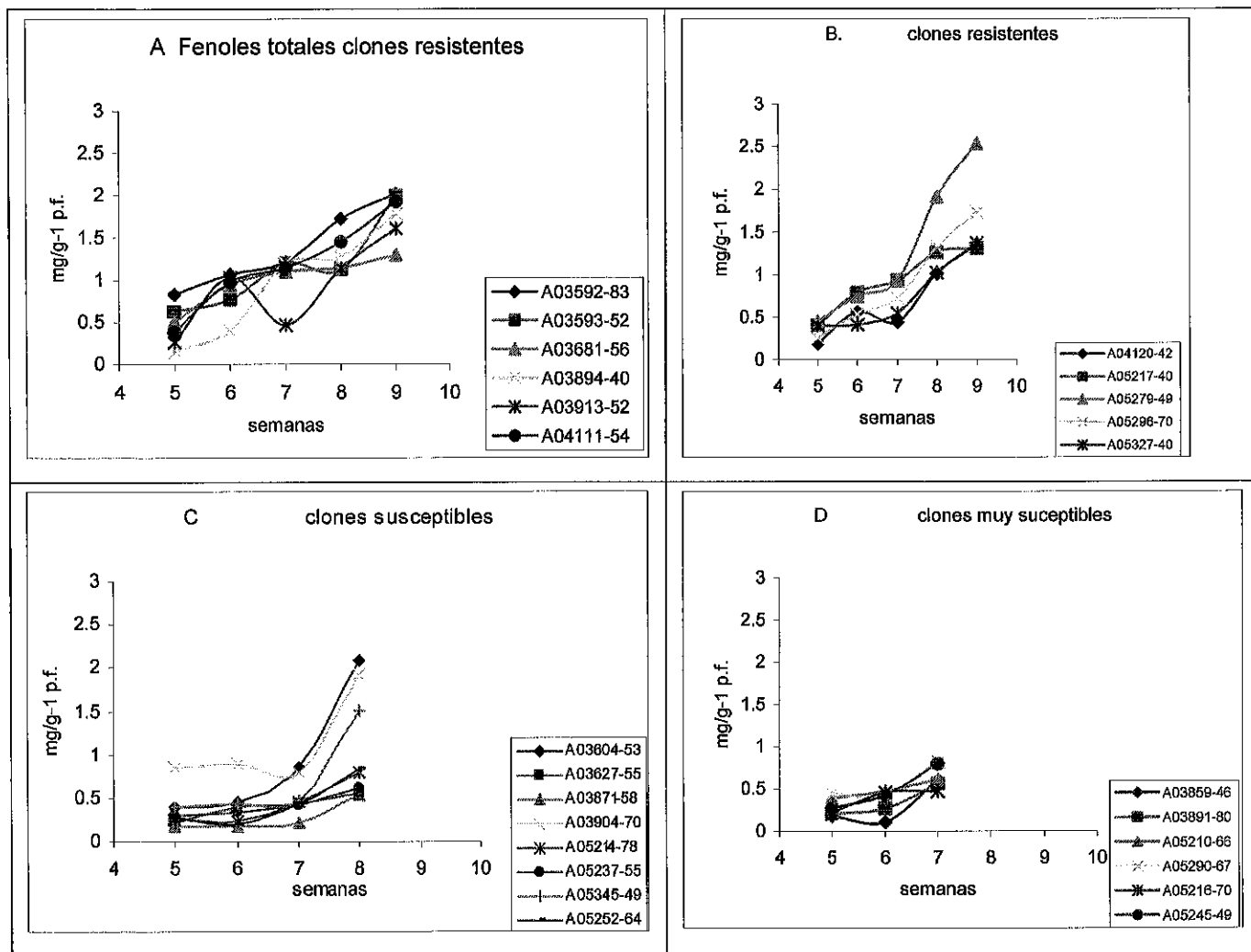


Fig. 6 Actividad Fenoles Totales, comparación entre clones susceptibles y muy susceptibles.,

6.3 Determinación de Fenilalanina amonio liasa (EC4.3.1.5 PAL)

La utilización de polvos de acetona, es determinante para llevar a cabo una adecuada extracción de esta enzima a nivel del tejido foliar, este tratamiento elimina de manera eficiente compuestos fenólicos y pigmentos que interfieren durante la cuantificación espectrofotométrica de la actividad PAL. La adición del mercaptoetanol y PVP dio mayor estabilidad, durante la extracción de la PAL, el mercaptoetanol neutraliza a los grupos sulfidrilos libres y el PVP, es un surfactante no iónico (Guiwen 1991).

En los clones resistentes A05296-70, A05327-40 y A04120-42, se observó que la actividad PAL, fue muy alta (Fig. 7), esto corresponde al incremento del porcentaje de infección, y esta de acuerdo a la acción bioquímica de esta enzima, pues es la primera que cataliza la biosíntesis de los fenilpropanoides en plantas superiores. Entre estos compuestos se encuentra la lignina, suberina, fitoalexina, flavonoides y compuestos fenólicos en general, cuya síntesis y acumulación es parte de la estrategia desarrollada por las plantas para evidenciar la invasión de patógenos, siendo por lo tanto, la inducción de esta enzima, muy relevante en los mecanismos de defensa (Rodríguez *et al.*, 2006).

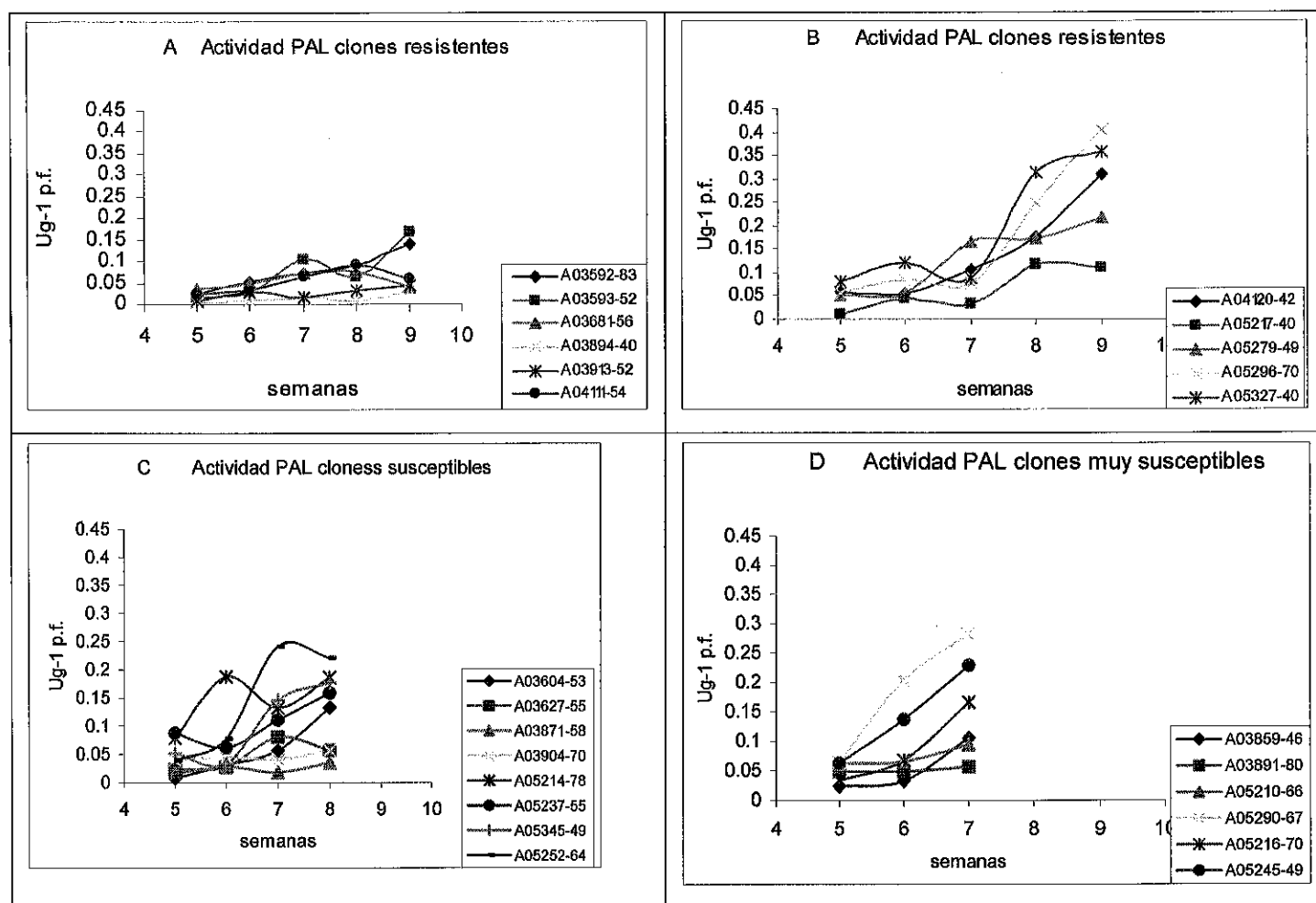


Fig. 7 Actividad PAL, en clones resistentes.

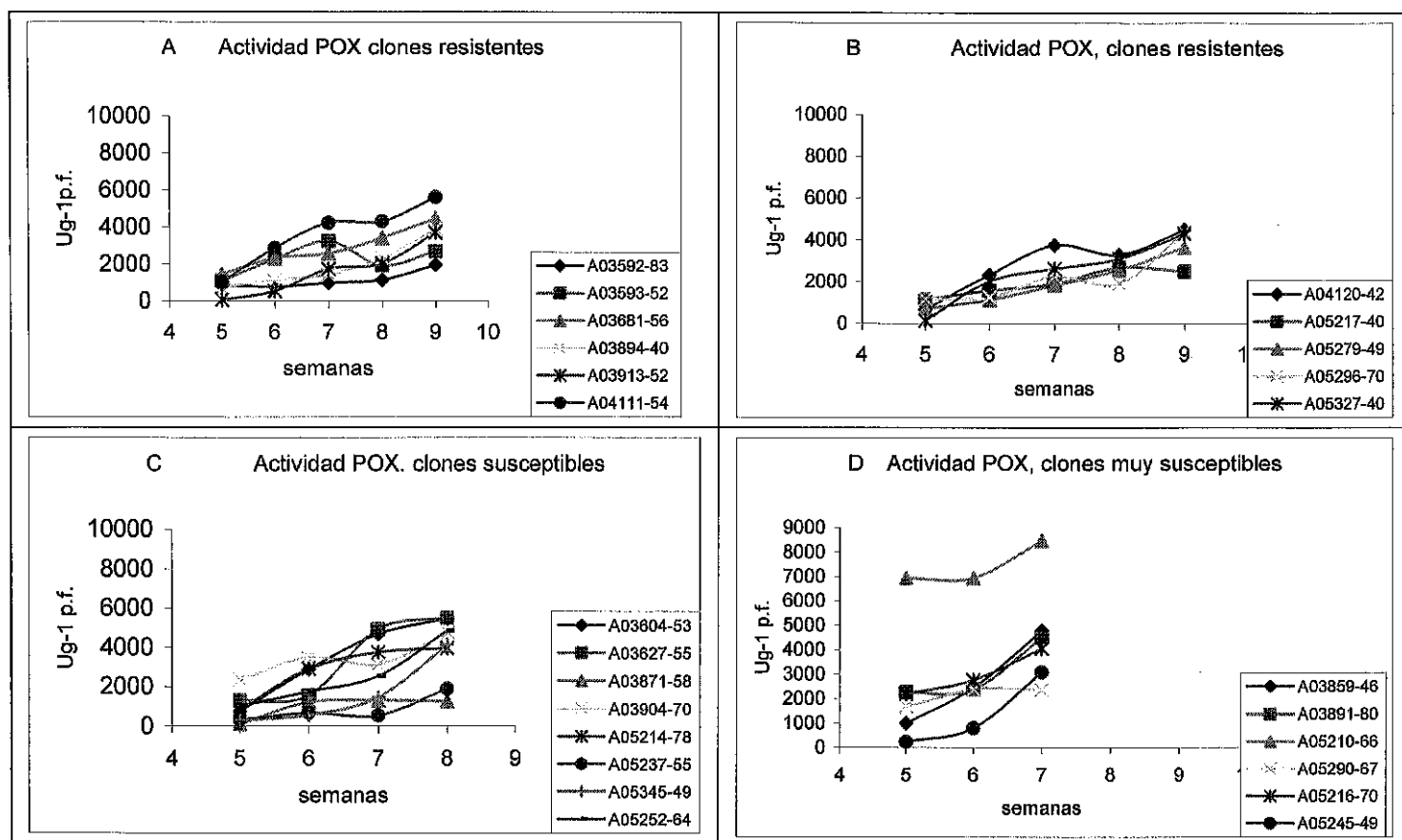


Fig.8 Actividad POX(A y B) clones resistentes, C (clones susceptibles) D clones muy susceptibles a *Phytophthora infestans*.

6.5 Determinación SOD.

Los clones con mayor actividad enzimática fueron A03894-40, A05296-70 y A05327-40, corresponde con el porcentaje de infección foliar. (Fig. 9) La enzima SOD convierte el O_2^- en H_2O_2 , la producción de peróxido de hidrógeno, se asocia a los diferentes procesos que ocurren en la pared celular y lamina media, como la lignificación y la activación de genes involucrados en la resistencia.

La SOD, actúa como una señal positiva, induce respuestas bioquímicas y fisiológicas funcionando como un agente oxidante directo contra el patógeno (Ehsani *et al.*, 2006). Se observa también un alto incremento en el clon susceptible A03871-58 y en el clon muy susceptible A05216-70.

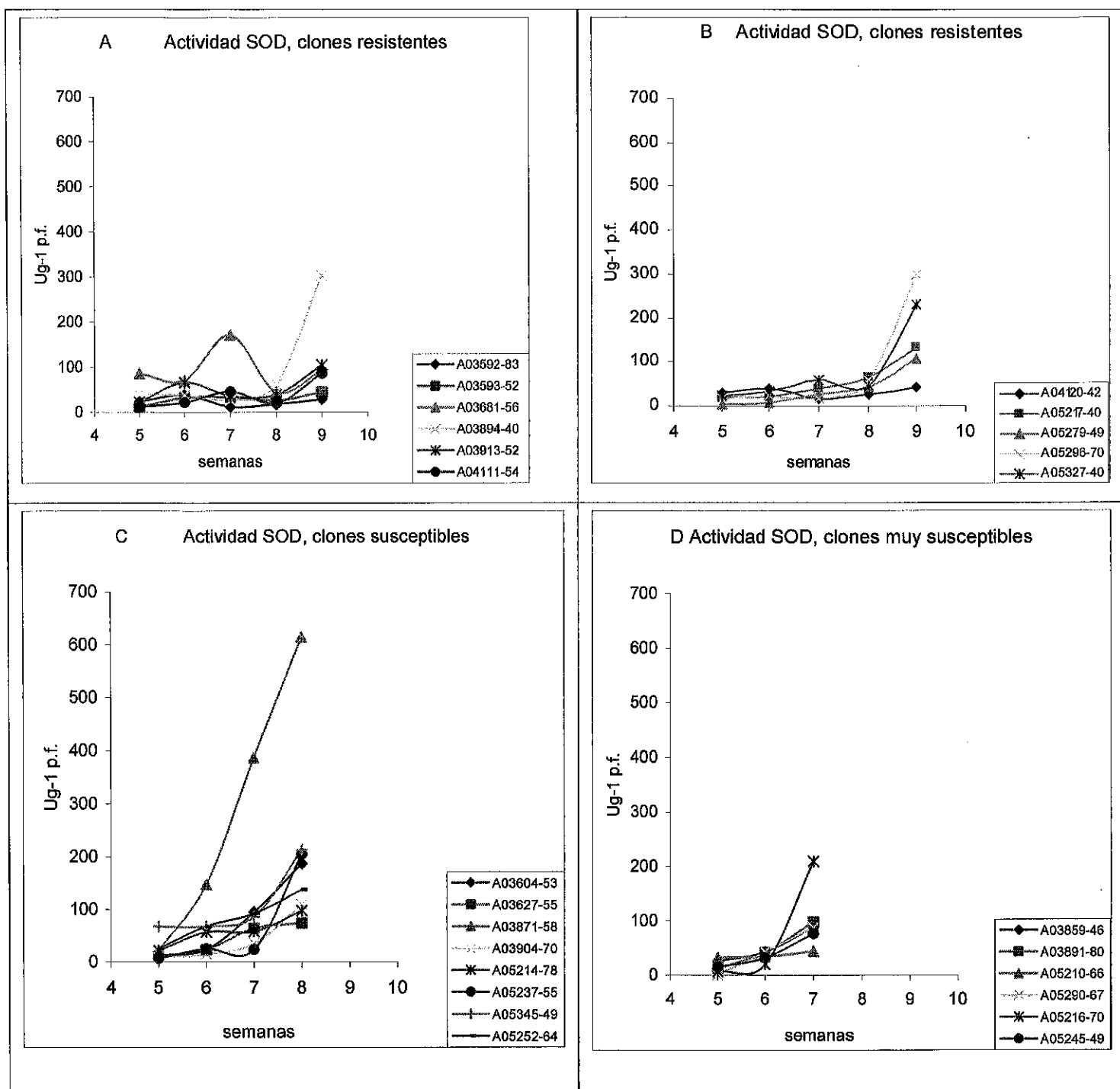


Fig.9 Actividad SOD en los clones seleccionados.

6.6 Rendimientos de los clones evaluados.

Los clones no representativos, en el rendimiento total en cosecha fueron la A03604-53, A05237-55, A05345-49, A05252-64 (cuadro2); dentro de esta selección las familias con altos rendimientos fueron A03894-40 con 1400g y la A05327-40 con 1100g

Cuadro 2. Rendimiento de los clones evaluados.

Respuesta a la infección	Clon	% de INF.	Rendimiento en gramos	N. tuberculo	Indi, Cosecha
Resis.	A03592-83	45	700	14	315
Resis.	A03593-52	30	650	15	195
Resis.	A03681-56	55	500	15	275
Resis.	A03894-40	40	1400	10	560
Resis.	A03913-52	50	650	15	325
Resis.	A04111-54	50	500	13	250
Resis.	A04120-42	30	730	15	219
Resis.	A05217-40	50	500	11	250
Resis.	A05279-49	50	630	24	315
Resis.	A05296-70	50	800	15	400
Resis.	A05327-40	40	1100	16	440
Suscep.	A03604-53	90	-----	-----	-----
Suscep.	A03267-55	80	900	25	720
Suscep.	A03871-58	80	500	9	400
Suscep.	A03904-70	95	950	14	902.5
Suscep.	A05214-78	85	730	15	620.5
Suscep.	A05237-55	70	-----	-----	-----
Suscep.	A05345-49	85	-----	-----	-----
Suscep.	A05252-64	90	-----	-----	-----
M. Sus..	A03859-46	100	558	27	558
M. Sus	A03891-80	100	700	12	700
M. Sus	A05210-66	100	500	9	500
M. Sus	A05210-66	100	500	9	500
M. Sus.	A05216-70	100	600	5	600
M. Sus.	A05245-49	95	650	8	617.5

(Resis.= Resistenete, Suscep=Susceptible. M.Sus.=Muy Susceptible, %INF=% Infección)

6.7 Análisis de Correlación enzimática (Evaluación de los clones resistentes).

La evaluación de los clones resistentes fue variada debido a que cada clon es único. En el Cuadro 3, se indica el resumen de las correlaciones entre los clones resistentes.

Cuadro 3 Correlaciones significativas, en clones resistentes

Clon	%INF.	Correlaciones significativas
AO3592-83	45	INF/PAL, INF/FEN, INF/POX FEN/PAL PAL/POX
A03593-52	30	INF/PAL, INF/FEN FEN/PAL
A03684-56	55	
A03894-40	40	INF/SOD, INF/POX, POX/SOD
A03913-52	50	INF/POX FEN/PAL
A04111-54	50	INF/FEN FEN/POX
A041120-42	30	INF/FEN
A05217-40	50	INF/FEN, INF/POX FEN/PAL POX/PAL, POX/FEN
A05279-49	50	INF/PAL, INF/FEN, INF/POX PAL/POX POX/FEN, POX/SOD SOD/FEN
A05296-70	50	INF/FEN FEN/PAL SOD/POX, SOD/PAL
A05327-40	40	INF/PAL, INF/POX FEN/PAL POX/PAL, POX/FEN

PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Al nivel de significancia de $P = \alpha \leq 0.05$ para todas las variables, en el clon A0359-83, se observaron las siguientes correlaciones (Cuadro 4), entre el porcentaje de infección total y la fenilalanina amonio liasa (INF/PAL) $r = 0.97279$, entre fenoles totales y porcentaje de infección es de $r = 0.93695$, entre porcentaje de infección (INF/POX) $r = 0.97093$ y entre fenoles totales y fenilalanina (FEN/PAL) ($r = 0.97695$), entre fenilalanina y peroxidasa (PAL/POX) la correlación es alta ($r = 0.92057$).

Estos datos sugieren la posibilidad de que la PAL, POX y FEN están estrechamente ligados en la defensa bioquímica de la planta contra el patógeno, también se refleja en el porcentaje de infección. Tanto la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa son enzimas, precursoras de biosíntesis de los flavonoides y lignina, a partir de la ruta bioquímica del ácido shiquímico. La lignina esta altamente correlacionada con la resistencia a *P. infestans* (Yoshida *et. al.*, 1995).

Cuadro 4. Correlación de las variables evaluadas para el clon A03592-83.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.97695 0.0042	-0.0327 ^{NS} 0.9583	0.92057 0.0265	0.97279 0.0054
FEN		1.00000	-0.06855 ^{NS} 0.9128	0.87671 ^{NS} 0.0510	0.93695 0.0188
SOD			1.00000	0.02679 ^{NA} 0.9659	-0.12724 ^{NS} 0.8384
POX				1.00000	0.97093 0.0059
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación del clon A03593-52.

El resultado de la evaluación de las correlaciones (cuadro 5), con $P=\alpha \leq 0.05$, fue de entre porcentaje final de infección y fenilalanina amonio liasa (INF/PAL) de $r= 0.92431$, entre porcentaje de infección y fenoles totales (INF/FEN) $r= 0.97381$ y entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL) de $r=0.97686$.

Estadísticamente no las siguientes correlaciones no tienen significancia entre fenilalanina amonio liasa y superóxido dismutasa (PAL/SOD) fue de $r= 0.83786$, y entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.70587$, en este caso, la actividad SOD tiene mayor correlación con la PAL que la enzima POX, sin embargo, si se observa que el incremento de las tres enzimas y de la actividad de fenoles totales, si se encuentra estrechamente relacionado en la defensa natural del clon.

Cuadro 5. Correlación enzimática del clon A03593-52

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.97686 0.0042	0.83786 ^{NS} 0.0764	0.70587 ^{NS} 0.1828	0.92431 0.0247
FEN		1.00000	0.84163 ^{NS} 0.0738	0.60090 ^{NS} 0.2838	0.97381 0.0051
SOD			1.00000	0.83372 ^{NS} 0.0793	0.73502 ^{NS} 0.1571
POX				1.00000	0.46542 ^{NS} 0.4296
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación del clon A03684-56.

En el caso del clon A03684-56, el análisis estadístico de las correlaciones entre las enzimas con $P=\alpha \leq 0.05$, indica que no existe correlación entre estas enzimas.(cuadro 6),

Cuadro 6. Correlaciones de las variables evaluadas clon A03681-56.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.45609 ^{NS} 0.4401	0.23636 ^{NS} 0.7019	0.26865 ^{NS} 0.6621	-0.08296 ^{NS} 0.8945
FEN		1.00000	0.09584 ^{NS} 0.8782	0.89309 ^{NS} 0.0413	0.79872 ^{NS} 0.1051
SOD			1.00000	-0.22610 ^{NS} 0.7146	-0.01393 ^{NS} 0.9823
POX				1.00000	0.88874 ^{NS} 0.0438
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A03894-40

Estadísticamente, la evaluación de las correlaciones (cuadro 7), con $P=\alpha\leq 0.05$, fue entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), de $r=0.82734$, entre fenilalanina amonio liasa y superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.89471$, y entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.86335$, estos datos no muestran evidencia significativa de que la concentración de las enzimas se encuentre relacionada ante el establecimiento de *P. infestans*, sin embargo si se observa relación entre la actividad SOD y el porcentaje de infección INF/SOD con $r=0.98762$ y en la correlación de POX e infección (INF/POX) con $r=0.96279$, así como existe una fuerte correlación entre la actividad POX/SOD con $r=0.91444$.

La relación POX/SOD, puede estar relacionada, con el papel del H_2O_2 , y la respuesta de hipersensibilidad, la generación del H_2O_2 , produce enlaces cruzados de las proteínas y la unión de compuestos fenólicos en la pared celular, y una fuerte actividad microbiciida (Roldan *et. al.*, 2008).

Cuadro 7. Correlación enzimática clon A03894-40.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.82734 ^{NS} 0.0839	0.89471 ^{NS} 0.0404	0.86335 ^{NS} 0.0594	0.88003 ^{NS} 0.0490
FEN		1.00000	0.69860 ^{NS} 0.1894	0.89654 ^{NS} 0.0393	0.77297 ^{NS} 0.1253
SOD			1.00000	0.91444 0.0297	0.98762 0.0017
POX				1.00000	0.96279 0.0086
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha\leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A03913-52.

La evaluación de las correlaciones, fue de $P=\alpha\leq 0.05$, entre porcentaje de infección y peroxidasa fue de $r=0.95620$, fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), fue de $r=0.98969$, entre fenilalanina amonio liasa y superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.84019$, y entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.82813$, estadísticamente estos valores no son significativos (cuadro 8);

Cuadro 8. Correlación actividad enzimática clon A03913-52

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.98969 0.0013	0.84019 ^{NS} 0.0748	0.82813 ^{NS} 0.0833	0.85133 ^{NS} 0.0673
FEN		1.00000	0.87475 ^{NS} 0.0522	0.76793 ^{NS} 0.1294	0.81109 ^{NS} 0.0957
SOD			1.00000	0.71592 ^{NS} 0.1738	0.68306 ^{NS} 0.2037
POX				1.00000	0.95620 0.0109
INF					1.00000

Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A04111-54

La evaluación de las correlaciones, con $P = \alpha \leq 0.05$, entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), fue de $r = 0.80641$, entre fenilalanina amonio liasa y superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r = 0.25876$, y entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxídasa (PAL/POX) fue de $r = 0.73007$, estos datos, estadísticamente no son significativos, solo la correlación de (FEN/POX) con $r = 0.93039$ y el porcentaje de infección y fenoles totales (INF/FEN) con $r = 0.95655$, muestra significancia (Cuadro 9).

Cuadro 9. Correlación enzimática clon A04111-54.

*

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.80641 ^{NS} 0.0992	0.25876 ^{NS} 0.6743	0.73007 ^{NS} 0.1614	0.77556 ^{NS} 0.1233
FEN		1.00000	0.76573 ^{NS} 0.1312	0.93039 0.0218	0.95655 0.0108
SOD			1.00000	0.80388 ^{NS} 0.1011	0.68647 ^{NS} 0.2005
POX				1.00000	0.85838 ^{NS} 0.0626
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

Correlación clon A041120-42.

La evaluación de las correlaciones, con $P=\alpha\leq 0.05$, No explica evidencia significativa de la actividad enzimática y el desarrollo de *P. infestans* en el clon A041120-42, los resultados fueron los siguientes, entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), fue de $r=0.31179$, entre fenilalanina amonio liasa y superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.67132$, y entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.18434$ (Cuadro 10)

Cuadro 10. Actividad enzimática del clon A041120-42.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.31179 ^{NS} 0.6095	0.67132 ^{NS} 0.2147	0.18434 ^{NS} 0.7666	-0.03715 ^{NS} 0.9527
FEN		1.00000	0.44209 ^{NS} 0.4560	0.78403 ^{NS} 0.1165	0.92781 0.0230
SOD			1.00000	-0.00560 ^{NS} 0.9929	0.18896 ^{NS} 0.7608
POX				1.00000	0.82611 ^{NS} 0.0847
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha\leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación A05217-40

La evaluación de las correlaciones, se observan en el cuadro 11, con $P=\alpha\leq 0.05$, fue de entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), $r=0.93177$, entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.95658$ también existe una correlación alta entre porcentaje final de infección y fenoles totales INF/FEN con $r= 0.98449$, entre porcentaje final de infección y peroxidasa INF/POX $r= 0.94567$ y FEN/POX con $r=0.97759$.

Cuadro 11. Correlación de actividad enzimática, clon A05217-40.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.93177 0.0212	0.78550 ^{NS} 0.1153	0.95656 0.0108	0.89477 ^{NS} 0.0403
FEN		1.00000	0.79302 ^{NS} 0.1095	0.97759 0.0040	0.98449 0.0023
SOD			1.00000	0.75346 ^{NS} 0.1414	0.87029 ^{NS} 0.0550
POX				1.00000	0.94567 0.0151
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha\leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05279-49

La evaluación de las correlaciones, en esta familia fue diversa, con un nivel de significancia de $P=\alpha\leq 0.05$, entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), fue de $r=0.87003$, entre fenilalanina amonio liasa y superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.86599$, esto sugiere que la correlación es muy baja, (cuadro 12); sin embargo si se observa una alta correlación entre porcentaje de infección final y fenilalanina amonio liasa (INF/PAL) $r= 0.93733$, porcentaje de infección y fenoles totales INF/FEN $r= 0.94352$, porcentaje de infección y peroxidasas con $r= 0.97075$ y entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) con $r=0.93575$, (FEN/SOD) $r=0.94551$, (FEN/POX) con $r= 0.98195$ y SOD/POX con $r= 0.96632$. Esto indica que el incremento de estas enzimas con los fenoles totales, se encuentra relacionado en la defensa natural. (Bourgaud *et al.*,2001)

Cuadro 12. Correlación de actividad enzimática del clon A05279-49

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.87003 ^{NS} 0.0551	0.86599 ^{NS} 0.0577	0.93575 0.0194	0.93733 0.0187
FEN		1.00000	0.94551 0.0151	0.98195 0.0029	0.94352 0.0160
SOD			1.00000	0.96632 0.0074	0.88573 ^{NS} 0.0456
POX				1.00000	0.97075 0.0060
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha\leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

Correlación clon A05296-70.

La evaluación de las correlaciones, fue alta con $P=\alpha\leq 0.05$, entre porcentaje final de infección y fenoles totales (INF/FEN) $r= 0.96019$. entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), fue de $r=0.96575$, entre fenilalanina amonio liasa y superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.92365$, entre la fenilalanina amonio liasa y entre SOD/POX $r=0.93934$ (cuadro 13).

Cuadro 13. Correlación actividad enzimática clon A05296-70

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.96575 0.0076	0.92365 0.0250	0.87319 ^{NS} 0.0532	0.87377 ^{NS} 0.0528
FEN		1.00000	0.83591 ^{NS} 0.0778	0.86031 ^{NS} 0.0613	0.96019 0.0095
SOD			1.00000	0.93934 0.0178	0.73717 ^{NS} 0.1552
POX				1.00000	0.85425 ^{NS} 0.0653
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05327-40

En la familia A05327-40, se observo al nivel de significancia de $P=\alpha \leq 0.05$, las siguientes correlaciones significativas, entre porcentaje de infección y fenilalanina amonio liasa (INF/PAL) $r= 0.91846$, entre porcentaje de infección y fenoles totales (INF/FEN) de $r= 0.98344$ y porcentaje de infección con la enzima peroxidasa (INF/POX) fue de $r=0.92808$, entre fenoles totales y fenilalanina amonio liasa (FEN/PAL), fue de $r=0.94708$, así como entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.91018$ y fenoles totales y peroxidasa fue de $r= 0.95746$ (Cuadro 13).

Cuadro 14. Correlación enzimática del clon A05327-40

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.94708 0.0145	0.69656 ^{NS} 0.1913	0.91018 0.0319	0.91846 0.0276
FEN		1.00000	0.83336 ^{NS} 0.0796	0.95746 0.0105	0.98344 0.0026
SOD			1.00000	0.88335 ^{NS} 0.0470	0.87833 ^{NS} 0.0500
POX				1.00000	0.92808 0.0229
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

6.8 Correlaciones en clones susceptibles y muy susceptibles.

Las correlaciones significativas de clones susceptibles, se pueden apreciar en el Cuadro 15. (en el anexo IV, se encuentran los cuadros correspondientes de correlaciones para cada clon susceptible). A diferencia de los clones resistentes, se puede observar el posible efecto de la enzima superóxido dismutasa y la correlación que tiene con todas las otras enzimas y con el porcentaje de infección final. La enzima SOD cataliza la disminución de O_2^- (radical anión superoxido) este actúa como un oxidante o como agente reductor y es capaz de oxidar proteínas carbohidratos y lípidos de microorganismos potencialmente patógenos (Garcia *et al* 2004).

Cuadro 15 Correlaciones significativas, en clones susceptibles

Clon	%INF.	Correlaciones significativas
A03604-53	90	INF/SOD, INF/POX PAL/FEN, PAL/SOD FEN/SOD
A03627-55	80	INF/SOD, INF/POX SOD/POX
A03871-58	80	INF/SOD
A03904-70	95	PAL/FEN, PAL/SOD, PAL/POX FEN/SOD
A05214-78	85	INF/FEN
A05237-55	70	INF/PAL, INF/FEN, INF/SOD, INF/POX FEN/SOD, FEN/POX SOD/POX
A05345-49	85	INF/PAL, INF/SOD, INF/POX FEN/SOD, FEN/POX SOD/POX
A05253-64	90	INF/SOD FEN/POX SOD/POX

PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

En el cuadro 16, se resume las correlaciones significativas para los clones muy susceptibles (los resultados completos se encuentran en el anexo IV), en la mitad de estos clones no existe correlación entre el porcentaje de infección final y la actividad enzimática, resaltan los clones A05245-49 y A05216-70 por su alta correlación enzimática

Cuadro 16 Correlaciones significativas, en clones muy susceptibles

Clon	%INF.	Correlaciones significativas
A03859-46	100	PAL/FEN, PAL/SOD, PAL/POX FEN/SOD SOD/POX
A03891-80	100	PAL/FEN, PAL/SOD, PAL/POX FEN/SOD, FEN/POX SOD/POX
A05210-66	100	PAL/FEN, PAL/SOD, PAL/POX, FEN/SOD, FEN/POX SOD/POX
A05290-67	100	INF/PAL, INF/SOD, INF/POX PAL/SOD, PAL/POX
A05216-70	100	INF/PAL, INF/SOD, INF/POX PAL/SOD, PAL/POX, PAL/FEN FEN/SOD, FEN/POX SOD/POX
A05245-49	95	INF/PAL, INF/FEN, INF/SOD, INF/POX, PAL/POX, PAL/SOD, PAL/FEN FEN/SOD, FEN/POX SOD/POX

PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

La correlación del clon A05216-70 con $P=\alpha\leq 0.05$, tuvo las siguientes resultados, entre porcentaje de infección y fenilalanina amonio liasa (INF/PAL) $r= 0.9087$, entre porcentaje de infección y superoxido dismutasa (INF/SOD) de $r= 0.99826$ y porcentaje de infección con la enzima peroxidasa (INF/POX) fue de $r=0.95702$, entre la fenilalanina amonio liasa y la superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.98170$, entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.99905$ y entre la peroxidasa y la superoxido dismutasa (POX/SOD) fue de $r= 0.97246$.

En el clon A05245-49, se observaron las siguientes correlaciones con $P=\alpha\leq 0.05$, entre el porcentaje de infección y fenilalanina amonio liasa (INF/PAL) $r= 0.99165$, entre el porcentaje de infección y fenoles totales (INF/FEN) una $r= 0.99957$, entre porcentaje de infección y superoxido dismutasa (INF/SOD) de $r= 0.99789$ y porcentaje de infección con la enzima peroxidasa (INF/POX) fue de $r=0.9893$ entre la fenilalanina amonio liasa y fenoles totales (PAL/FEN) $r=0.98746$, entre la fenilalanina amonio liasa y la superoxido dismutasa (PAL/SOD), fue de $r=0.98118$, entre la fenilalanina amonio liasa y la peroxidasa (PAL/POX) fue de $r=0.96190$ y entre la peroxidasa y la superoxido dismutasa (POX/SOD) fue de $r= 0.99659$ (cuadros 17 y 18).

Cuadro17 Correlación clon A05216-70

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.73003 0.4790	0.98170 0.1220	0.99905 0.0278	0.96875 0.1596
FEN		1.00000	0.58652 ^{NS} 0.6010	0.75913 ^{NS} 0.4512	0.53770 ^{NS} 0.6386
SOD			1.00000	0.97246 0.1497	0.99826 0.0376
POX				1.00000	0.95702 0.1873
INF					1.00000

PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

Cuadro 18. Correlación Clon A05245-49

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.98746 0.1009	0.98118 0.1237	0.96190 0.1763	0.99165 0.0823
FEN		1.00000	0.99936 0.0228	0.99300 0.0754	0.99957 0.0186
SOD			1.00000	0.99659 0.0526	0.99789 0.0414
POX				1.00000	0.98913 0.0940
INF					1.00000

PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección

7. DISCUSIÓN GENERAL.

Las plantas con resistencia, tienen mayor actividad enzimática, como respuesta al ataque del patógeno (Agrios 2007), sin embargo algunos clones de papa (*Solanum tuberosum* L) susceptibles y muy susceptibles al tizón tardío, evaluados en este trabajo presentaron actividad enzimática alta, tal es el caso de las siguientes clones A05216-70 y A05245-49.

En todos los casos la concentración de fenoles totales, y el porcentaje de infección aumentaron al paso de las semanas por el establecimiento del oomiceto.

Si se observo correlación con $P=\alpha\leq 0.05$, entre la actividad enzimática FEN/PAL PAL/SOD y PAL/POX, en los clones A05296-70 y A05217-40.

En el estudio enzimático del clon A03592-83 se observo una fuerte correlación entre INF/PAL, INF/FEN, INF/POX PAL/FEN y PAL/POX, esta relación directa, es una evidencia de la resistencia del clon, además el índice de cosecha fue 315, con esto se puede inferir que hay una buena base genética para la resistencia contra *P. infestans*.

Se observo que en los clones A03894-40 y A04111-54 hubo una alta correlación entre PAL/POX y POX/SOD. La POX se determina por la disminución del peróxido de hidrógeno, y SOD cataliza la disminución de O_2 convirtiéndolo en peróxido de hidrogeno. Las dos enzimas también forman parte del proceso de lignificación de la pared celular ante el ataque de cualquier patógeno y su relación es una evidencia clara de la actividad enzimática en plantas resistentes (Roldan *et al.*, 2008).

El clon A05279-49, es un buen material de resistencia, este clon tuvo las siguientes correlaciones con altos niveles de significancia INF/PAL, INF/FEN, INF/POX, PAL/POX, POX/FEN, POX/SOD, el índice de cosecha fue de 315.

En los clones A03681-56 y 4041120-42274, no existe correlación de la actividad enzimática, sin embargo en campo el grado máximo de infección en ambos casos fue bajo de 55% y de 30% respectivamente, la defensa natural de estas plantas podría estar relacionada con otras rutas bioquímicas (Lozoya *et al.*, 2007).

La actividad de proteínas PR, pudieran explicar la resistencia a la enfermedad de los clones A03681-56 y A041120-42, debido a que estas proteínas se acumulan en las plantas después y durante la infección del patógeno (Ilacer G. 2000).

De acuerdo al establecimiento del tizón tardío, por *P. infestans* los clones probados presentan, resistencia de tipo horizontal, o poligénica, y confiere resistencia a la variedad del patógeno *P. infestans*. Los datos que arrojo este experimento sirven de base para establecer material genético y buscar los genes implicados en esta resistencia.

8. CONCLUSIÓN.

Los clones de papa, mostraron diversos grados de resistencia y susceptibilidad a *Phytophthora infestans* los resistentes presentaron mayor actividad enzimática correlacionada con los grados de infección final, que los clones susceptibles y muy susceptibles.

El tipo de resistencia fue poligénica, o resistencia horizontal, debido a la naturaleza de *P. infestans* y a la correlación entre la actividad enzimática, como respuesta al establecimiento del patógeno.

No hubo relación directa entre el rendimiento y grados de infección ya que las plantas altamente infectadas tuvieron un mayor índice de cosecha.

Gayoso C., Pomar F., Bernal M., 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. Varannum infected by *Phytophthora capsici* L. Scientia Horticulturae 102:1-13.

Gebhardt C., Valkomen J. 2001. Organization of gene controlling disease resistance in the potato genome Annu. Rev. Phytopathol. 39: 79-107.

Giovanni E., Marco F., Renato F., and Grimaldo S. 2009. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. Biol Direct. 4: 1176-1186.

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol, 43: 205-227

Gogoi R. Singh V. and Srivatava D. 2001. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Kamal Bunt . Plant Pathol. 50: 470-478.

Griffith G. and Shaw D. 1998. Polymorphism in *Phytophthora infestans* for Mitochondrial Haplotype are detected after PCR Amplification DNA from pure Cultures or from Host Lesions. Applied of Environmental Microbiology 64:407-414.

Guiven W. C. and Breen J. 1991. Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:865-869.

Hammersehmidt R., Kuc J. 1982. Lignification as a metabolism for induced systemic resistance in cucumber physiology. Plant Pathology 20:161-171.

Hammersehmidt R. 1999 Phytoalexins What Have we Learned After 60 years? Annual Review Phytopathology 37: 285-308.

Henfling J.W: 1987. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Segunda edición Centro Internacional de la papa. Lima Peru Boletín de Información Técnica No. 4., 25p.
Herrmann KM, Weaver L., 1999. The shikimate pathway. Anu Rev. Plant Physiol. 50:473-503.

Hu X., Bidney D., Yalapani, N., Duvick J., Castro O., Folkerst O., and Lu G. 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalato-oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133:170-181.

Jaramillo S.V. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Universidad nacional de Colombia 130 p.

Jones D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and role in plants development. *Phytochemistry* 23: 1349-1359.

Judelson H.S. and Robert S. 1999. Multiple Loci Determining Intensity to Phenylamid Fungicides in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 89: 754-760.

Kuc J. 1995. Phytoalexins Stress Metabolism and Disease Resistance in Plant. *Annual Review Phytopathology* 33:273-279.

Kolovayev V.A 2002. Donors of Potato Horizontal Resistance to *Phytophthora infestans* CONFERENCE lat blight managing the global threat ABSTRACT 11-13 July Hamburg Germany.
EAPR.

Lagrimini L.M, Gingas V., Finger F., Rothstein S., Liu T. 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiology* 114:1187-1196.

Little and Magill. 2003. Elicitation of defense response genes in *Sorghum floral* tissues infected by *Fusarium thapsinum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 3:271-279.

Lozoya-Saldaña H. Guzmán Galindo L., Fernández Pavia S., Niklaus J.G. 2006. *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary I. Especificidad Hospedero-Patógeno y Componentes de Resistencia. *Agrociencia* 40: 205-217.

Lozoya-Saldaña H., Rivera-Hinojosa R. Colinas León M., 2007. Fenoles, Peroxidasas y Fenilalanina Amonio-lyasa: Su relación con la Resistencia Genética de Clones de

Papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el Tizón Tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Barry) . Agrociencia 41: 479-489.

Llacer G., López M., Trapero A., Bello A. 2000. Patología Vegetal. Segunda Edición .Editorial Grupo Mundi-Prensa. 789 p

Mahajan R., Prabhsharan S., Krishan L., 1985 .Nematicidal activity of some phenolic ompounds against *Meloidogyne incognita*. Review Nematology 8:161-164.

Malthur N., Vya A. 1995. Changes in isoenzymes patters of peroxidase and polyphenoloxidase by fungi in roots of *ziziphus* species J. Plant Physiol 145: 498-500.

Martínez-Tellez M. and La Fuente M.T. 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in flavedo of chilled fortune mandarint fruit Journal of Plant Physiology 150:674-678.

Medina M. and Plah H. 1999 Viability of oospores of *Phytophthora infestans* under Field Conditions in Northeas America . Canadial Journal of Plant Pathology 21:137-143.

Nagarathna K., Shetty S.A., Shetty H. S. 1993. Phenylalanine amonia-lyase activity in pearl millet seedlings and ist relation to downy mildew disease resistance. Journal Exp. Bot. 44:1291-1296.

Robinson A. 2008. Fitomejoramiento de los cultivos para reducir la dependencia de Plaguicidas. (Publicación en linea <http://www.shareBooks>. 433p.Fecha de consulta Junio 2009).

Rodríguez Y., Fernández A., Solórzano E., Peteira B. 2006. Inducción de enzimas de defensa en dos variedades de arroz (*Oryza sativa*) por el hongo micorrizico arbuscular *G. mosseae*. Rev. Colomb. Biotecnol. 8: 35-49.

Roldan A., Vivancos D., Hernandez P., Carrasco L. 2008. Superoxide dismutase and total peroxidase activities in relation to drought recovery performance of mycorrhizal seedlings grown in an amended semiarid soil. *Journal Plant Physiol.* 5: 715-722.

SAS Institute, 1999-2000. *Sas user's guide: Statistics. Version 8.1.* SAS Institute Inc. Cary, NC USA. 1290.

Sha J., Klessing D., 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis- related β 1-3 glucanase gene PR-2d. *Plant Journal* 10:1089-1101.

Smart C., Mayton E., Mizubuti G. Fry E. 2000 Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90:987-994.

Smith B., Murois E., Midlan S., Sim J. 1998. Accumulation of salicylic acid and 4 hydroxy benzoic acid in phloem fluid of cucumber during systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 116: 231-238.

Van De Velde F., Rantwijk F., and Sheldon R. 2001. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic sintesis. *Trends in Biotechnology* 19:73-80.

Vargas E. 1998 .Cambios Inducidos por *Nacobbus averrans* Thorne y Allen en la Actividad de Fenilalanina-Amonio-Liasa (PAL) en Plantas de Chile (*Capsicum nahum* L.) Serrano CM-334 Resistentes a *Phytophthora capsici* L. Tesis Maestria. Colegio de Posgraduados Montecillos, México. 5-24p.

Wastie R.L., Ingran D.S y William P., 1991. Breeding for Resistance. In: *Advances in Plant Pathology* Academic Press Limited 7: 193-224.

Waterman P. and Mole S., 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites* Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford UK. 238p.

Woloshuk C., Meulenhoff A., 1991. Pathogen Induced Proteins with Inhibitory Activity Toward *P. Infestan* . *The Plant Soil* 3: 619-628

www.sagarpa.gob.mx.(fecha de consulta junio 2009).

www.wikipedia.org.mx.(fecha de consulta junio 2009).

Yoshida K, Kaoften P., Matsui T., and Shinmyo A., 2003. Molecular biology and Application of Plant Peroxidase genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 665-670.

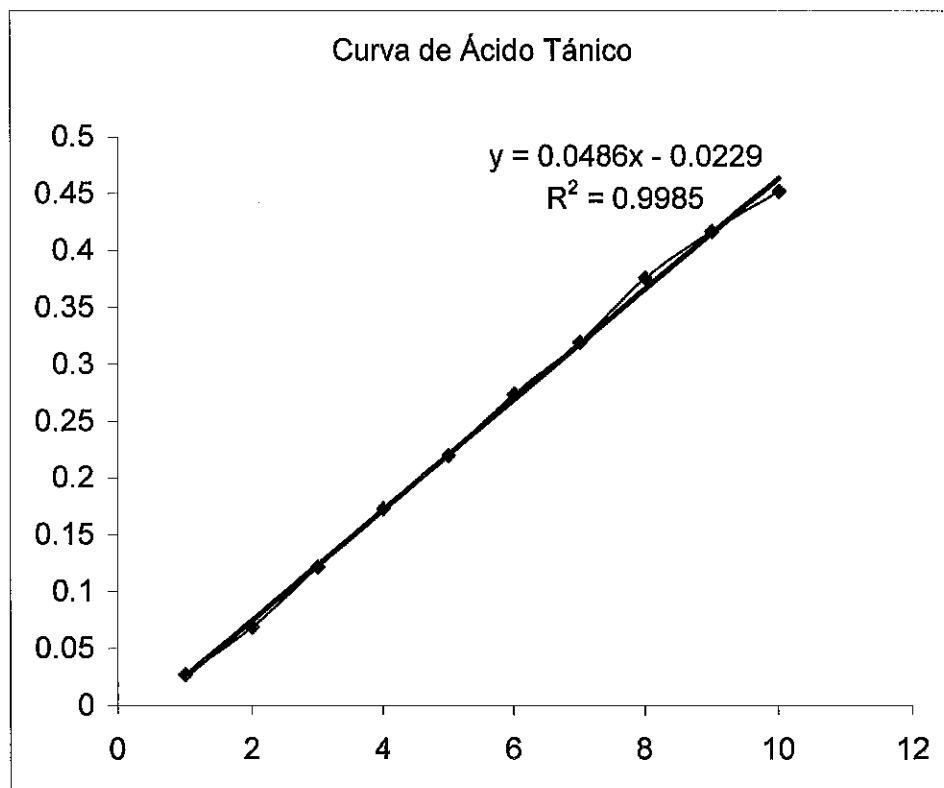
Yoshioka H. .Humatama N., Nackajima K, Katou S. Kawakita K. Rowland O., and Doke N. 2003. *Nicotiana benthamina* gp91phoxhomologs NorbohA and NorbohB participate in H₂O₂ acumulation and resistance to *Phytophthora infestans* Plant Cell 15:706-718.

ANEXO I.

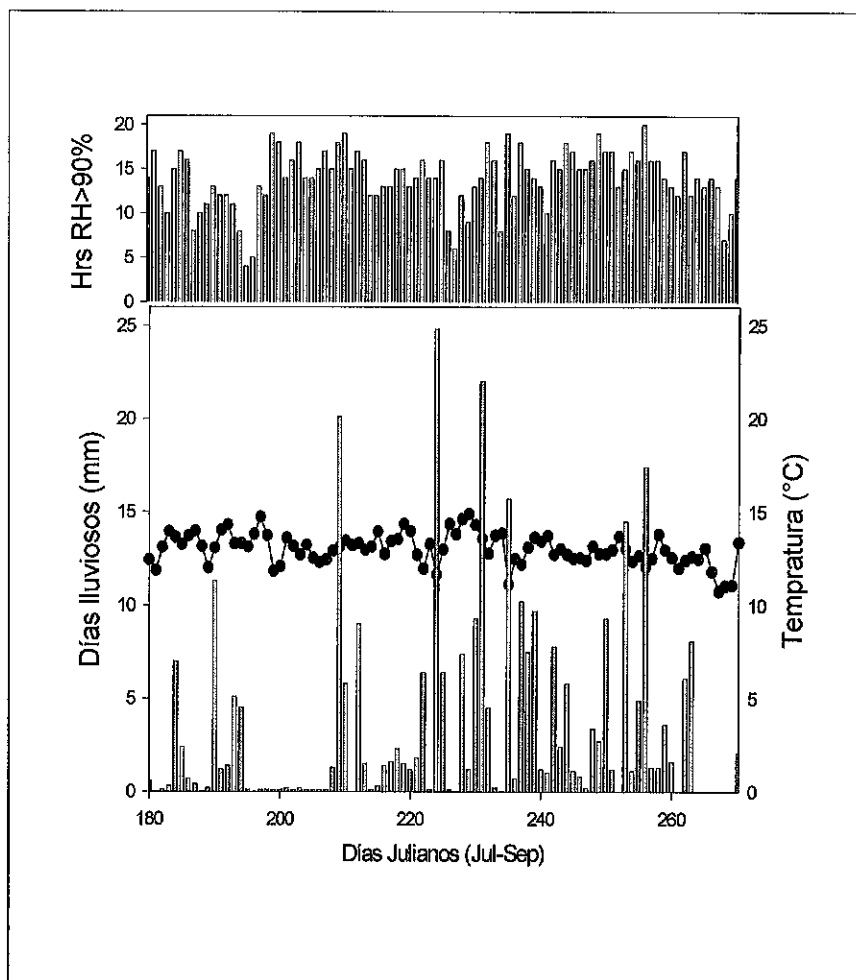
Escala Henfling 1987.

Valor de la escala	escala	limite	Síntomas
1	0		-----
2	2.5	señales-<5	Tizón presente. Máximo 10 lesiones por planta
3	10	5 -< 15	Plantas aparentemente saludables, pero las lesiones son fácilmente vistas a distancia. Máximo de área foliar afectado por las lesiones o destruido corresponde a no mas de 20 hojas.
4	25	15 -< 35	Tizón fácilmente reconocido en más plantas. 25% de follaje es cubierto o destruido por las lesiones.
5	50	35 -< 65	El lote se observa verde, sin embargo, todas las plantas están afectadas. Algunas hojas muertas y la mitad del follaje destruido.
6	75	65 -< 85	El lote se observa verde con manchas cafés. Cercadie 75% de cada planta es afectada. Las hojas de la mitad para debajo de la planta están destruidas.
7	90	85 -< 95	El lote tiene un aspecto verde con café. Únicamente las hojas de arriba de la planta están verdes Muchos tallos tienen largas lesiones.
8	97.5	95 -<100	El lote se observa un color café. Muy pocas áreas verdes de hojas se pueden ver .Hay más lesiones y muerte en tallos.
9	100		Todas las hojas y tallos están muertos.

ANEXO II Curva del ácido tánico.



ANEXO III Condiciones ambientales Valle de Toluca Verano 2007.



Condiciones meteorológicas imperantes durante el ciclo de cultivo de los lotes experimentales. (Estación meteorológica propia).

ANEXO IV. Correlaciones Clones Susceptibles y Muy Susceptibles.

Correlación Clon A03604-53.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.98615 0.0139	0.98423 0.0158	0.87899 ^{NS} 0.1210	0.85858 ^{NS} 0.1414
FEN		1.00000	0.97772 0.0223	0.79850 ^{NS} 0.2015	0.81929 ^{NS} 0.1807
SOD			1.00000	0.88868 ^{NS} 0.1113	0.92123 0.0788
POX				1.00000	0.93937 0.0606
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlacion clon A03627-55

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.63868 ^{NS} 0.3613	0.87674 ^{NS} 0.1233	0.88834 ^{NS} 0.1117	0.89164 ^{NS} 0.1084
FEN		1.00000	0.89061 ^{NS} 0.1094	0.83116 ^{NS} 0.1688	0.85370 ^{NS} 0.1463
SOD			1.00000	0.99216 0.0078	0.99702 0.0030
POX				1.00000	0.99869 0.0013
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05210-66

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.95772 0.1858	0.99885 0.0306	0.99553 0.0602	0.67090 ^{NS} 0.5318
FEN		1.00000	0.97043 0.1552	0.92625 0.2460	0.85588 ^{NS} 0.3460
SOD			1.00000	0.98984 0.0908	0.70572 ^{NS} 0.5012
POX				1.00000	0.59783 ^{NS} 0.5921
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación A05290-67

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.76184 ^{NS} 0.4486	0.98400 0.1140	0.92631 0.2459	0.98558 0.1083
FEN		1.00000	0.86505 ^{NS} 0.3346	0.46165 ^{NS} 0.6945	0.64124 ^{NS} 0.5568
SOD			1.00000	0.84438 ^{NS} 0.3599	0.93967 0.2223
POX				1.00000	0.97671 0.1377
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05216-70

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.73003 0.4790	0.98170 0.1220	0.99905 0.0278	0.96875 0.1596
FEN		1.00000	0.58652 ^{NS} 0.6010	0.75913 ^{NS} 0.4512	0.53770 ^{NS} 0.6386
SOD			1.00000	0.97246 0.1497	0.99826 0.0376
POX				1.00000	0.95702 0.1873
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación Clon A05245-49

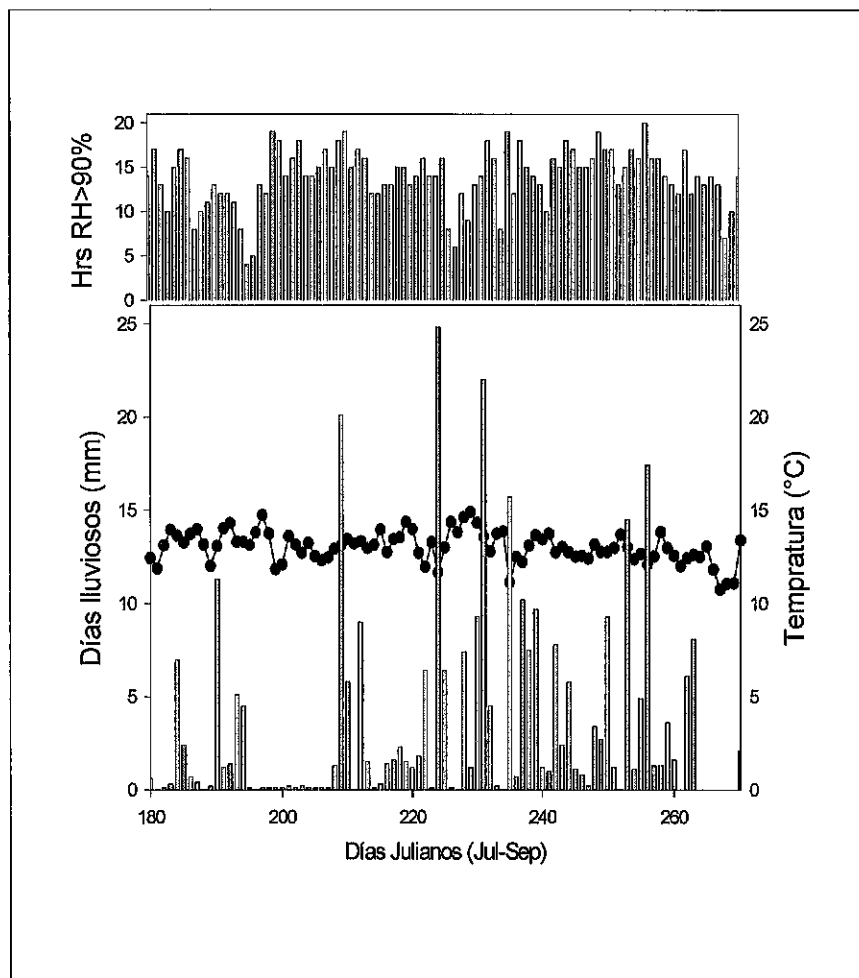
	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.98746 0.1009	0.98118 0.1237	0.96190 0.1763	0.99165 0.0823
FEN		1.00000	0.99936 0.0228	0.99300 0.0754	0.99957 0.0186
SOD			1.00000	0.99659 0.0526	0.99789 0.0414
POX				1.00000	0.98913 0.0940

INF

1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

ANEXO III Condiciones ambientales Valle de Toluca Verano 2007.



Condiciones meteorológicas imperantes durante el ciclo de cultivo de los lotes experimentales. (Estación meteorológica propia).

ANEXO IV. Correlaciones Clones Susceptibles y Muy Susceptibles.

Correlación Clon A03604-53.

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.98615 0.0139	0.98423 0.0158	0.87899 ^{NS} 0.1210	0.85858 ^{NS} 0.1414
FEN		1.00000	0.97772 0.0223	0.79850 ^{NS} 0.2015	0.81929 ^{NS} 0.1807
SOD			1.00000	0.88868 ^{NS} 0.1113	0.92123 0.0788
POX				1.00000	0.93937 0.0606
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlacion clon A03627-55

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.63868 ^{NS} 0.3613	0.87674 ^{NS} 0.1233	0.88834 ^{NS} 0.1117	0.89164 ^{NS} 0.1084
FEN		1.00000	0.89061 ^{NS} 0.1094	0.83116 ^{NS} 0.1688	0.85370 ^{NS} 0.1463
SOD			1.00000	0.99216 0.0078	0.99702 0.0030
POX				1.00000	0.99869 0.0013
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación Clon A03871-58

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.78051 ^{NS} 0.2195	0.65038 ^{NS} 0.3496	0.58404 ^{NS} 0.4160	0.55336 ^{NS} 0.4466
FEN		1.00000	0.85809 ^{NS} 0.1419	0.36529 ^{NS} 0.6347	0.71803 ^{NS} 0.2820
SOD			1.00000	0.70803 ^{NS} 0.2920	0.97319 0.0268
POX				1.00000	0.81272 ^{NS} 0.1873
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A03904-70

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.97658 0.0234	0.91543 0.0846	0.94382 0.0562	0.61935 ^{NS} 0.3806
FEN		1.00000	0.95400 0.0460	0.88154 ^{NS} 0.1185	0.65823 ^{NS} 0.3418
SOD			1.00000	0.89106 ^{NS} 0.1089	0.85231 ^{NS} 0.1477
POX				1.00000	0.74134 ^{NS} 0.2587
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación Clon A05214-78					
	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.44621 ^{NS} 0.5538	0.82959 ^{NS} 0.1704	0.76885 ^{NS} 0.2312	0.50021 ^{NS} 0.4998
FEN		1.00000	0.86791 ^{NS} 0.1321	0.69374 ^{NS} 0.3063	0.95643 0.0436
SOD			1.00000	0.88076 ^{NS} 0.1192	0.88452 ^{NS} 0.1155
POX				1.00000	0.84721 ^{NS} 0.1528
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05237-55					
	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.92155 0.0784	0.86918 ^{NS} 0.1308	0.82216 ^{NS} 0.1778	0.95036 0.0496
FEN		1.00000	0.94673 0.0533	0.94683 0.0532	0.96361 0.0364
SOD			1.00000	0.99226 0.0077	0.97972 0.0203
POX				1.00000	0.95445 0.0456
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05345-49

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.74073 ^{NS} 0.2593	0.79096 ^{NS} 0.2090	0.86859 ^{NS} 0.1314	0.96909 0.0309
FEN		1.00000	0.99688 0.0031	0.97183 0.0282	0.87673 ^{NS} 0.1233
SOD			1.00000	0.98521 0.0148	0.91043 0.0896
POX				1.00000	0.96305 0.0370
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación clon A05253-64

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.74010 ^{NS} 0.2599	0.85195 ^{NS} 0.1480	0.77168 ^{NS} 0.2283	0.84082 ^{NS} 0.1592
FEN		1.00000	0.87532 ^{NS} 0.1247	0.96007 0.0399	0.65178 ^{NS} 0.3482
SOD			1.00000	0.96755 0.0325	0.93538 0.0646
POX				1.00000	0.81695 ^{NS} 0.1831
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación Clon A03859-46

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.97439 0.1444	0.98567 0.1079	0.95754 0.1862	0.70078 ^{NS} 0.5057
FEN		1.00000	0.92249 0.2523	0.86818 ^{NS} 0.3306	0.52240 ^{NS} 0.6501
SOD			1.00000	0.99245 0.0783	0.81107 ^{NS} 0.3978
POX				1.00000	0.87669 ^{NS} 0.3195
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.

Correlación Clon A03891-80

	PAL	FEN	SOD	POX	INF
PAL	1.00000	0.98662 0.1042	0.94669 0.2088	0.99935 0.0230	0.61722 ^{NS} 0.5765
FEN		1.00000	0.98654 0.1046	0.99188 0.0812	0.73722 ^{NS} 0.4723
SOD			1.00000	0.95772 0.1858	0.83778 ^{NS} 0.3677
POX				1.00000	0.64528 ^{NS} 0.5535
INF					1.00000

*Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$, NS= no significativa, PAL-Fenilalanina amonio liasa, POX-Peroxidasa y SOD-Superoxido dismutasa INF-Infección.