



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

## DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

### INDUCCIÓN DE DEFENSA EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) POR FUNGICIDAS NO ESPECÍFICOS CONTRA EL OOMICETO *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.

#### TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

ROBLEDO ESQUEDA MARTHA NAYELI



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
JEFATURA DE EXAMENES PROFESIONALES

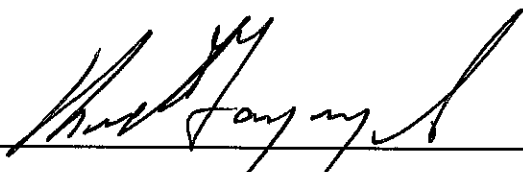
Chapingo, Estado México, Julio de 2009



**INDUCCIÓN DE DEFENSA EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) POR FUNGICIDAS NO ESPECÍFICOS CONTRA EL OOMICETO *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Martha Nayeli Robledo Esqueda de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

DIRECTOR



---

Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR



---

Dr. Víctor Manuel Pinto

ASESOR



---

M.C. Antonio Segura Miranda

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría (Generación 39).

A la Universidad Autónoma Chapingo por los estudios realizados.

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

A PICTIPAPA, por el apoyo brindado

Al comité asesor por su asesoría en el desarrollo del presente trabajo. Por sus enseñanzas, aportaciones, dedicación y confianza Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña, Dr. Víctor Manuel Pinto y M.C Antonio Segura Miranda.

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

Al Maestro Luis Emilo Castillo Sánchez por su valiosa colaboración al momento de reportar los resultados de esta tesis.

## DEDICATORIA

*Mi tesis la dedico con mucho amor y cariño.*

*A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa, por darme fuerza y voluntad para seguir y concluir la maestría, por acompañarme siempre y por guiar mis pasos en todo momento.*

*A mis padres con gratitud, quienes con su dedicación y sacrificio hicieron posible mi anhelo de ser profesional. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado, ahora que también termino mi maestría.*

*A Ericka porque siempre ha estado a mi lado en las buenas y en las malas, por su cariño, por su gran ayuda, pero sobre todo por la compañía en las largas jornadas laborales, por enseñarme muchísimas cosas, pero sobre todo, por su amistad.*

*A Pepe, Tania y Samantha porque siempre he contado con ustedes para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y la amistad ¡Gracias!*

*A mi esposo, Oscar intentando expresarle mi mas profundo y sincero amor pero sobre todo para expresarle mi gratitud por su apoyo incondicional, su comprensión generosa y su tolerancia infinita a mis pretensiones intelectuales.*

*A mi pequeña Paula, razón de mi ser y sentido en la vida, ojala pueda servirte de ejemplo para tu superación, en la esperanza de que verás un mundo mejor.*

*A la familia Flores Hernández que con tanto cariño siempre me han visto como a una de sus hijas, gracias por su apoyo y atenciones siempre en todo momento.*

*A mis queridas amigas Lulú, Adriana, Lupita, Blanca, Verónica, Rocio, Olivia e Isabel gracias por tanto apoyo, tanto cariño y tanta solidaridad, ustedes me ayudaron mucho a creer en mí y a alcanzar esta superación en mi vida.*

*A mi cuñada y cuñados que con mucho afecto, siempre me dan ánimos para seguir adelante.*

*A mis maestros, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación en la maestría en especial: al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, al Dr. Víctor Manuel Pinto y al M.C Antonio Segura Miranda por su apoyo y tiempo ofrecido.*

*A la Universidad Autónoma Chapingo y en especial al Departamento de Parasitología Agrícola que me dieron la oportunidad de formar parte de ellos. ¡Gracias!*

## **DATOS BIOGRAFICOS**

La autora de esta tesis nació en México, Distrito Federal (Mayo de 1977). Realizó sus estudios a nivel superior en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la cual egreso en el año de 2005 obteniendo el título de Bióloga Experimental.

Ha trabajado en el Colegio de Postgraduados en el Instituto de Fitosanidad en el Proyecto de Investigación: Biodiversidad, Estructura y Función de las comunidades Naturales y Agroecosistemas en la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas, Veracruz y Calakmul, Campeche.

Actualmente es profesora de la Academia Experimental en el bachillerato de la Universidad del Valle de México.

## ÍNDICE

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>                                  | I   |
| <b>DEDICATORIA</b>                                      | II  |
| <b>DATOS BIOGRAFICOS</b>                                | III |
| <b>1. INTRODUCCION</b>                                  | 1   |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                     | 3   |
| 2.1 Objetivo general                                    | 3   |
| 2.2 Objetivos específicos                               | 3   |
| 2.4 Hipótesis                                           | 3   |
| <b>3. REVISION DE LITERATURA</b>                        | 4   |
| 3.1 El tizón tardío de la papa                          | 4   |
| 3.2 Resistencia de las plantas a Enfermedades           | 6   |
| 3.3 Reacción de Hipersensibilidad                       | 7   |
| 3.4 Defensa por medio de compuestos fenólicos           | 8   |
| 3.4.1 Fitoalexinas                                      | 8   |
| 3.5 Peroxidasas (E C.1.11.1.7, POX)                     | 13  |
| 3.5.1 Naturaleza y estructura                           | 14  |
| 3.5.2 Funciones                                         | 15  |
| 3.5.3 Polimorfismo                                      | 16  |
| 3.5.4 Localización tisular y subcelular                 | 17  |
| 3.5.5 Papel fisiológico en la lignificación             | 18  |
| 3.6 Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL) y Fenoles | 20  |
| 3.7 Superóxido Dismutasa (15.1.1.SOD)                   | 22  |
| 3.8 Defensa debida a la resistencia Sistémica Adquirida | 23  |
| 3.9 Modo de Acción de los Fungicidas Empleados          | 24  |
| 3.9.1 Inhibidores de la Respiración                     | 26  |
| 3.9.2 Fungicidas para Oomicetes                         | 27  |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| <b>4. MATERIALES Y METODOS</b>                             | 28 |
| 4.1 Localización del experimento                           | 28 |
| 4.2 Material Vegetal                                       | 28 |
| 4.3 Diseño experimental y tratamientos                     | 28 |
| 4.4 Laboratorio                                            | 31 |
| 4.4.1 Fenoles                                              | 31 |
| 4.4.2 Peroxidasa (EC.1.11.1.7,POX)                         | 31 |
| 4.4.3 Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5.PAL)            | 31 |
| 4.4.4 Superóxido dismutasa (1.15.1.1.SOD)                  | 32 |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                           | 33 |
| 5.1 Porcentaje de Infección                                | 33 |
| 5.2.1 Análisis Estadístico                                 | 33 |
| 5.3 Observaciones en Campo                                 | 33 |
| 5.4 Fenoles Totales                                        | 35 |
| 5.5 Actividad de Peroxidasas (EC.1.11.1.7, POX)            | 37 |
| 5.6 Actividad de Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5.PAL) | 40 |
| 5.7 Actividad de Superóxido dismutasa (1.15.1.1.SOD)       | 41 |
| 5.8 Análisis de Correlación                                | 44 |
| <b>6. DISCUSIÓN GENERAL</b>                                | 49 |
| <b>7. CONCLUSIONES</b>                                     | 50 |
| <b>8. LITERATURA CITADA</b>                                | 51 |
| <b>9. APENDICES</b>                                        | 69 |

## ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS

|                                                                                                                                                                                                    |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1.</b> Rutas biosintéticas fenilpropanoide y de los monolignoles.....                                                                                                                    | 12     |
| <b>Figura 2.</b> Ordenación espacial del centro activo de las peroxidasas.....                                                                                                                     | 14     |
| <b>Figura 3.</b> Relación entre la movilidad en la planta de un fungicida y su momento de actividad en relación con el momento de invasión en los tejidos de la planta por parte del patógeno..... | 26     |
| <b>Figura 4.</b> Diseño Experimental y Tratamientos.....                                                                                                                                           | 30     |
| <b>Figura 5.</b> Infección Foliar por efecto de la aplicación de Fungicidas Sistémicos no Específicos.....                                                                                         | 34     |
| <b>Figura 6.</b> Promedio de Fenoles alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.....                                     | 37     |
| <b>Figura 7.</b> Promedio de Actividad POX alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.....                               | 39     |
| <b>Figura 8.</b> Promedio de Actividad PAL alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.....                               | 41     |
| <b>Figura 9.</b> Promedio de Actividad SOD alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.....                               | 43     |
| <br><b>Cuadro 1A.</b> Modos de Acción de los fungicidas.....                                                                                                                                       | <br>26 |
| <b>Cuadro 1.</b> Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Amistar®.....                                                        | 44     |
| <b>Cuadro 2.</b> Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Cabrio-C®.....                                                       | 45     |
| <b>Cuadro 3.</b> Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Cabrio 20 EG®.....                                                   | 46     |
| <b>Cuadro 4.</b> Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Aliette ®.....                                                       | 47     |
| <b>Cuadro 5.</b> Correlación entre variables para los tratamientos Testigo.....                                                                                                                    | 48     |



**Inducción de Defensa en Papa (*Solanum tuberosum* L.) por Fungicidas no específicos contra el Oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.**

**Induction of Defense in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by nonspecific Fungicides against the Oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.**

Martha Nayeli Robledo Esqueda<sup>1</sup>, Héctor Lozoya Saldaña<sup>2</sup>

**RESUMEN**

Las nuevas generaciones de fungicidas no solo se enfocan sobre su efecto en el patógeno, sino también sobre el hospedante. Importa saber hasta que punto los productos estimulan las reacciones de defensa de la planta contra factores adversos. Aquí se incluyeron tratamientos al tubérculo-semilla y al follaje de papa (*Solanum tuberosum* L.), cv. susceptible Alpha, con fungicidas que no son específicos contra oomicetos (Azoxyestrobina 50%, como Amistar®; Boscalid 25.2% + pyraclostrobina 12.8%, como Cabrio-C®; pyraclostrobina 20%, como Cabrio®; y Fosetil-Aluminio 80%, como Aliette®), en el valle de Toluca, Méx., con los objetivos de estudiar hasta que punto los tratamientos estimulan reacciones de defensa de la planta y la protegen, indirectamente, de la infección natural del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary), y a la vez cuantificar la síntesis y activación de algunos sistemas de defensa del hospedante. No hubo protección posterior al follaje cuando la aplicación fue solo a la siembra, pues la infección foliar en los tratamientos fue similar a la del testigo sin fungicidas, pero con una aspersión al follaje 30 días después de la siembra, la infección final fue de 60-80% respecto al testigo (100%). En general, hubo similitud entre los patrones de síntesis y/o actividad de los metabolitos de defensa estimulados por los productos, sin diferencias estadísticas significativas. Así, a medida que avanzó la infección se detectaron incrementos en fenoles (FEN), en peroxidasa (POX) y en fenilalanina-amonioliasa (PAL), con irregularidades en la acción de la POX y la superóxido dismutasa (SOD) al aplicarse los productos a la semilla y al follaje, y con descenso de la actividad de la SOD cuando los productos se aplicaron solo a la semilla. No obstante, destaca el estímulo inducido por Fosetil-Aluminio (Aliette®) en la actividad de SOD y PAL cuando se aplicó a la semilla y al follaje, superando significativamente al resto de los tratamientos. Las similitudes de respuesta bioquímica en la mayoría de las combinaciones metabolito-agroquímico se respaldan con las altas correlaciones obtenidas entre las variables, lo que refleja la estrecha interacción o actividad conjunta entre los metabolitos cuantificados. Por el contrario, el estímulo atípico de Fosetil-Aluminio (Aliette®) sobre SOD y PAL cuando se aplicó a la semilla y al follaje, se limitó a la correlación de la SOD con la infección y con POX, mientras que la PAL actuó de manera independiente, sin correlación significativa con las otras variables. Se concluye que los productos incluidos en el presente estudio estimulan respuestas comunes de defensa no-específica de la planta, pero no lo suficiente como para protección contra patógenos para los que dichos productos no actúan, y que las estrechas correlaciones entre los metabolitos manifiestan el carácter poligénico de las respuestas de defensa de la planta.

**Palabras clave:** papa, metabolitos, FEN, POX, SOD, PAL, fungicidas no específicos contra oomicetos.

**ABSTRACT**

The new fungicide generations not only focus on their effect in the pathogen, but also on the hospedante. It matters to know to what extent the products stimulate the reactions of defense of the plant against adverse factors. Here treatments to the tubercle seed and the foliage of potato were included (*Solanum tuberosum* L.), cv. susceptible Alpha, with oomicetos specific fungicides that are not con (Azoxyestrobina 50%, like Amistar®; Boscalid 25.2% + pyraclostrobina 12.8%, like Joist; pyraclostrobina 20%, like Cabrio®; and Fosetil-Aluminum 80%, like Aliette®), in the valley of Toluca, Méx., with the objectives to study to what extent the treatments stimulate reactions of defense of the plant and protect it, indirectly, of the natural infection of tizón delayed (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary), and simultaneously to quantify the synthesis and activation of some systems of defense of the hospedante. The foliage was no protection subsequent to when the application only went to seedtime, because the foliar infection in the treatments was similar to the one of the witness without fungicides, but with an aspersión to the foliage 30 days after seedtime, the final infection was of 60-80% with respect to the witness (100%). Generally, there was similarity between the synthesis landlords and/or activity of metabolites of defense stimulated by products, without significant statistical differences. Thus, as balance sheet the infection detected increases in phenols (FEN), peroxidasa (POX) and fenilalanina-amonioliasa (PAL), with irregularities in the action of the POX and superoxide dismutasa (SOD) when being applied the products to the seed and the foliage, and with reduction of the activity of the SOD when the products were only applied to the seed. However, it emphasizes the stimulus induced by Fosetil-Aluminum (Aliette®) in the activity of SOD and the PAL when it was applied to the seed and to the foliage, surpassing significantly to the rest of the treatments. The similarities of biochemical answer in the majority of the combinations metabolite-agro-chemical lean back with the high correlations obtained between the variables, which reflects the close interaction or joint activity between quantified metabolites. On the contrary, the atypical stimulus of Fosetil-Aluminum (Aliette®) on SOD and the PAL when it was applied to the seed and to the foliage, were limited the correlation of the SOD with the infection and POX, whereas the PAL acted of independent way, without significant correlation with the other variables. One concludes that the products including in the present study stimulate common answers of not-specific defense of the plant, but not sufficient it like for protection against pathogens for which these products do not act, and that the close correlations between metabolites show the polygenetic character of the answers of defense of the plant.

**Key words:** potato, metabolites, FEN, POX, SOD, PAL, nonspecific fungicides against oomicetos.

<sup>1</sup> Tesista. Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo  
<sup>2</sup> Director de Tesis. Profesor Investigador Universidad Autónoma Chapingo

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia de la planta a enfermedades por patógenos depende a menudo de si ésta puede reconocer al patógeno al inicio del proceso de infección.

Las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos ya sea mediante características estructurales como barreras físicas que impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células y tejidos, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo (Agrios, 2001).

Las fitoalexinas son sustancias tóxicas que las plantas producen en cantidades apreciables sólo después de haber sido estimuladas por los diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos o haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos. La mayoría de esas fitoalexinas se produce en las plantas en respuesta principalmente a la infección causada por hongos, en general son mucho más tóxicas para hongos que para bacterias (Salisbury y Ross, 1994).

La resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno, estos resultados se han observado en tubérculos de papa (Goodman *et al.*, 1986). Los patógenos que atacan a las plantas inducen alteraciones metabólicas, así como la síntesis de enzimas por parte de la planta, que dan lugar al desarrollo de la resistencia en torno a los sitios de infección. Una enzima que por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor, en los tejidos enfermos es la fenilalanina-amonioliasa (PAL) que es una enzima clave en la producción de la molécula básica precursora en la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Agrios, 2001).

Existen estudios que relacionan cuantitativamente las síntesis de sustancias tóxicas para el patógeno, con el nivel de resistencia genética de la papa (*Solanum tuberosum*) y el uso de elicitores químicos (Ardila, 2005), como Pyraclostrobin-Boscalid al ataque de tizón (*Phytophthora infestans*, Lozoya, *et al.*, 2001). Para entender los mecanismos de defensa involucrados, en este modelo, se han llevado a cabo estudios histopatológicos y bioquímicos. Es así como se conoce la respuesta defensiva de la papa contra este

patógeno, involucra procesos como: la acumulación de fenoles (FEN), peroxidasas (POX), y la fenilalanina amonioliase (PAL) (Cornide *et al.*, 1994, Navarrete y Mayo, 2004, Lozoya, *et al.*, 2006).

Las nuevas generaciones de fungicidas no solo se enfocan sobre su efecto en el patógeno, sino también sobre el hospedante. Importa saber hasta que punto los productos estimulan las reacciones de defensa de la planta contra factores adversos. En el presente estudio se incluyeron productos específicos contra patógenos del suelo no-oomicetos, en tratamiento a la semilla, esperando que confirieran resistencia de la planta contra el posterior ataque de *Phytophthora infestans* Mont. de Bary al follaje.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Estudiar las respuestas de defensa en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), inducida por fungicidas no específicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Cuantificar los cambios de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD) y fenoles totales en el hospedante, por efecto de los tratamientos.

Correlacionar dichos cambios con los porcentajes de infección y la influencia de protección química, para establecer el carácter mono o poligenico de la respuesta del hospedante a la infección al estímulo por los tratamientos.

### **2.3 Hipótesis**

Los fungicidas Azoxystrobin (Amistar®), Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C®), Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG®) y Fosetil – Aluminio (Aliette®), estimularán la actividad de la fenilalanina- amonio-liasa (PAL), peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD) y la concentración de fenoles totales en plantas de papa infectadas por el oomiceto fitopatógeno *Phytophthora infestans* Mont. De Bary.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. El tizón tardío de la papa

Entre las enfermedades que afectan a la papa (*Solanum tuberosum* L), el "tizón tardío" causado por *Phytophthora infestans* Mont. de Bary es la enfermedad más devastadora. Este microorganismo pertenece al Phylum Oomycota, perteneciente al Subphylum Stramenopila, comprende a más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas y los gametos masculinos, con paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres aunque siempre necesitan la presencia de agua.

Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos. (Raven, Evert y Eichhorn, 1999), lo que luego fue confirmado por filogenias moleculares, basadas en las secuencias del RNA ribosomal, datos de los aminoácidos compilados para las proteínas de la mitocondria y cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos, evidenciando que los Oomycetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos (Kamoun, 2002).

Los Oomycetes, están más relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Son conocidos como organismos "heterocontes" lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo y adornado con nastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y un flagelo mas corto, delgado, cilíndrico y en forma de látigo o flecha.

Las características que diferencian al género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de B' 1-3 glucano en vez de quitina, carencia de hipoxidación del esqualene a esteroides y diferencias en las vías metabólicas, como resultado de un sistema genético único (Griffith *et al.*, 1992).

Los análisis de las secuencias moleculares de la subunidad 18S del rDNA (ribosomal) han confirmado que están estrechamente relacionados con las Chrysophytas, Diatomeas y algas cafés, pero se separaron relativamente temprano de las formas pigmentadas. (Raven Evert y Eichhorn, 1999). Estos investigadores observaron que las secuencias de

la subunidad 18S del rDNA son similares entre las algas fotosintéticas heterocontes y miembros del género *Phytophthora*. Al comparar las secuencias de la subunidad 28S rDNA, encontraron poca sustitución de nucleótidos entre los seis grupos de *Phytophthora*.

Al analizar el gen de la familia actina, Smart *et al.*, (2000) encontraron que todos los miembros Oomycota contienen dos tipos de actina, los cuales probablemente surgieron por una duplicación del gen, que ocurrió después de la divergencia de los Oomycetes y de las algas cromofitas, por lo que ahora se ubican en las algas cafés pertenecientes al Subphyllum Stramenopila.

Los estudios poblacionales de *Phytophthora infestans* se iniciaron casi paralelamente con los programas de mejoramiento de la papa, para buscar e incorporar la resistencia a este patógeno. Existen marcadores moleculares, bioquímicos y fenotípicos que han posibilitado la identificación de aislamientos distintos en una población, producto de un organismo que tiene la posibilidad de reproducirse sexual y asexualmente, conduciendo a cambios en las poblaciones que pueden ser introducidas a otras regiones por procesos de migración.

Desde que se reportó el tipo de apareamiento A2 en el Oeste de Europa en 1984, se esperaba un dramático desarrollo de nuevas poblaciones del patógeno, lo que condujo a los patólogos a realizar análisis locales de las poblaciones, dado que el tipo A1 era el único tipo de apareamiento reportado fuera de México, considerado el centro de origen de *Phytophthora infestans* (Fry. *et al.*, 1993).

Una población se refiere a un grupo de individuos (aislamientos) de una misma especie que se encuentra estructurada o delimitada por barreras geográficas, por lo tanto el primer indicio de cambios importantes en la población lo constituyó la presencia del tipo de apareamiento A2. La Determinación de los alelos isoenzimáticos de glucosa 6-fosfato isomerasa (*Gpi*), enzima málica (*Me*) y peptidasa (*Pep*), proporcionaron la primera evidencia genética de la diploidia de *Phytophthora infestans* y permitió hacer las primeras comparaciones de las poblaciones. Mas recientemente se establecieron marcadores como la sonda G57 para la huella de ADN nuclear y cebadores específicos para la amplificación de DNA mitocondrial.

En las dos últimas décadas se han estudiado las poblaciones alrededor del mundo para lo cual se han evaluado miles de aislamientos, utilizando características fenotípicas (tipo de

apareamiento, virulencia/agresividad de razas y sensibilidad a Metalaxyl), marcadores bioquímicos (isoenzimas *Gpi* y *Pep*) y moleculares.

En algunas poblaciones de *Phytophthora infestans* se pueden encontrar aislamientos diploides y poliploides; por lo tanto los aislamientos diploides en su estado vegetativo, podrían presentar factores heterocigóticos que gobiernan la expresión fenotípica, de tal forma que en los cromosomas homólogos se pueden expresar alelos dominantes y recesivos en un solo gen, esto explica por que en ciertas mutaciones que generan resistencia a un fungicida (Metalaxyl), la expresión de la resistencia esta condicionada por uno o dos genes con dominancia incompleta.

La utilización de marcadores de resistencia a fungicidas permite determinar si se da o no una recombinación de factores genéticos, que puede resultar de la ocurrencia de factores sexuales que involucran cambios en el DNA mitocondrial en caso de la reproducción asexual.

Varios investigadores han evaluado los tipos de apareamiento presentes en diferentes países. Fry. *et al.*, en el 1993, opinan que el tipo de apareamiento de *Phytophthora infestans* A2 pudo haber estado presente, pero no se detectaba por bajas frecuencias, en diferentes países por fuera de México durante varios años. García *et al.*, (2000) encontraron al noroeste de México que el tipo de apareamiento predominante en 1994-1995, fue el A2, el cual estaba prácticamente desaparecido en 1996-1997. La presencia de ambos tipos de apareamiento de manera simultánea sólo se observó en unos pocos campos donde crecían simultáneamente papa y jitomate.

El tizón tardío es considerada una de las enfermedades mas importantes del cultivo de la papa, porque si el cultivo no esta protegido adecuadamente con aplicaciones planificadas de fungicidas y por otra parte las condiciones ambientales en donde se desarrollan los cultivos, son al mismo tiempo óptimas para el desarrollo del patógeno (temperatura de 12 a 15°C y humedad relativa de 80 a 100%), los campos de papa pueden ser destruidos en un lapso de 10 a 15 días. Esto es lo que ocurre en algunas zonas paperas de México y del mundo donde las pérdidas pueden ser totales (Abad y Abad, 1995).

### **3.2. Resistencia de las plantas a Enfermedades**

Las plantas han evolucionado y desarrollado complejos y variados mecanismos de defensa para protegerse de herbívoros y enfermedades. Estos mecanismos pueden ser

constitutivos (es decir, activos durante toda la vida de la planta) o inducidos después de un ataque por herbívoros o patógenos. Estudios recientes han sugerido que las defensas inducibles en las plantas pudieran tener ventajas selectivas sobre las defensas constitutivas (Agrawal, 1998). Aunque las defensas inducibles a menudo son localizadas en el sitio del ataque, los mecanismos de defensa de la planta pueden ser activados de manera sistémica en toda la planta después de un ataque o una infección localizados (Kessman *et al.*, 1994). Uno de los primeros reportes publicados sobre resistencia sistémica en plantas fue el de Chester (1933), quién usó el término "inmunidad fisiológica adquirida". Más tarde se reportó que las plantas de tabaco exhibían "resistencia sistémica adquirida" después de infecciones locales con el virus del mosaico del tabaco. Otros términos que han sido usados para describir la resistencia sistémica en plantas incluyen "resistencia translocada", "inmunización de la planta", y "resistencia sistémica inducida" (Chester, 1933).

La resistencia sistémica inducida es el proceso de protección activa (sistémica) de una planta, el cual depende de las barreras físicas o químicas levantadas por la planta hospedera, las cuales son activadas por un agente inductor, cuando son aplicadas a una sola parte de la planta (Kloepper *et al.*, 1992). Se han reportado varios inductores "clásicos" de RSI, incluyendo patógenos, patógenos atenuados, productos químicos sintéticos, y productos metabólicos del hospedero o de los agentes infecciosos (Liu *et al.*, 1995) sin embargo, han sido poco frecuentes los reportes de resistencia inducida en el campo por agentes inductores clásicos.

### **3.3. Reacción de Hipersensibilidad**

La reacción de hipersensibilidad es uno de los mecanismos de defensa más importantes de las plantas. Esto ocurre solamente en combinaciones incompatibles entre huésped y patógenos como hongos, bacterias, virus y nematodos. En estas combinaciones no se observa diferencia ninguna en la forma de penetración del patógeno en la epidermis de plantas susceptibles y resistentes. Sin embargo, después de la infección, las células infectadas en las variedades resistentes pierden rápidamente su turgencia, se vuelven de color café y mueren; mientras que las células infectadas de variedades susceptibles sobrevivieron mucho más tiempo.



Los procesos involucrados en la reacción hipersensible comprenden la pérdida de permeabilidad de las membranas celulares, aumento de la respiración, acumulación y oxidación de compuestos fenólicos y la producción de fitoalexinas.

Como resultado final de esta intensa actividad intracelular se produce la muerte y colapso de las células infectadas y las que las rodean. Así, los hongos y las bacterias fitopatógenas que se encuentran dentro del área de actividad de la reacción hipersensible, permanecen aislados por el tejido necrótico y mueren rápidamente. En las enfermedades virales, la reacción hipersensible siempre da como resultado la formación de las llamadas lesiones locales, en las cuales el virus podría sobrevivir por un tiempo considerable, pero generalmente está en concentraciones muy bajas y su diseminación más allá de la lesión se detiene (Jiménez, *et al.*, 1997).

### **3.4. Defensa por medio de compuestos fenólicos**

Compuestos fenólicos "comunes"

Se incluye en este grupo a un conjunto de compuestos fenólicos que, aunque suelen estar presentes también en las plantas no infectadas, aumentan su concentración de forma considerable tras la entrada del patógeno. Protegen a la planta frente al patógeno, y se ha comprobado que su formación después de la entrada de éste es mucho mayor en variedades resistentes que en variedades susceptibles (Dai, 1995).

#### **3.4.1. Fitoalexinas**

Las fitoalexinas son sustancias tóxicas que las plantas producen en cantidades apreciables sólo después de haber sido estimuladas por los diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos, o bien después de haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos.

Las fitoalexinas se producen por las células sanas adyacentes a las células necróticas y dañadas, en respuesta a sustancias (llamadas inductores) que se difunden a partir de las células dañadas. La resistencia se produce cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno. Es decir, son sustancias

que se producen tanto en variedades resistentes como susceptibles, pero sólo en las primeras alcanzan concentraciones suficientes.

La mayoría de las fitoalexinas conocidas son tóxicas para los hongos fitopatógenos, cuyo desarrollo inhiben, pero algunas también son tóxicas a bacterias, nematodos y otros organismos patógenos (Goodman *et al.*, 1986).

Varias docenas de compuestos químicos que tienen propiedades químicas similares a las de las fitoalexinas se han aislado de plantas que pertenecen a más de 20 familias. Algunas de las fitoalexinas mejor estudiadas incluyen la faseolina y cievitona en el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la pisatina en el chicharo (*Pisum sativum*), la hidroxifaseolina en la soya (*Glycine max*), en alfalfa (*Medicago sativa*) la medicarpina y el cumesterol, en cebolla (*Allium cepa*) las llamadas cibulinas, la rishitina en la papa (*Solanum tuberosum*) el gosipol en el algodón (*Gossypium herbaceum*), en zanahoria (*Daucus carota*) es la 6-metoximeleina y el capsidol en chile (*Capsicum annum*) (Agrios, 2001; Jankiewicz y Sobiczewski, 2003).

En algunos casos parece ser que la producción de fitoalexinas es inhibida por unas sustancias (llamadas supresores) producidas por el patógeno. Se sabe también que muchos hongos fitopatógenos metabolizan la fitoalexina de su planta huésped hasta un compuesto no tóxico y que, por tanto, disminuyen su efectividad.

Sin embargo Hahn y otros investigadores en 1982, encontraron que los fragmentos polisacáridos pectínicos de las paredes celulares de las plantas pueden servir como inductores de la producción de fitoalexinas. Este fenómeno puede ser interesante ya que las enzimas del hongo al destruir las paredes celulares del hospedante producen muchos fragmentos de este tipo. Por otro lado parece ser probable que los factores físicos como congelamiento, causan la producción de fitoalexinas estimulando primeramente la producción de las enzimas que separan fragmentos de las paredes celulares de la planta sirviendo enseguida como elicitores (Lyon y Albersheim, 1982).

Mucharromah *et al.*, en 1995 al inocular rodajas de tubérculos de papa con razas incompatibles de *Phytophthora infestans* encontraron una acumulación de fitoalexinas.

En vid las fitoalexinas, sustancias fenólicas derivadas del grupo estilbeno, se han reconocido como compuestos antimicrobianos que defienden la planta, junto al resveratrol y viniferina, del ataque de algunos hongos como: *Botrytis cinérea*, *Plasmopara vitícola*, *Uncinola necator* como también de las radiaciones UV (Bostock *et al.*, 1981).

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

El etileno aumenta bruscamente durante el estrés y cuando este estrés es causado por la infección de un patógeno, el etileno puede iniciar la producción de fitoalexinas, que es lo que sucede en zanahoria (Boller *et al.*, 1983).

El nivel de ácido jasmónico (AJ) o su ester metílico (AJ-Me), también aumenta rápidamente en plantas heridas o dañadas por los patógenos y existe la suposición de que debido a este fenómeno se incrementa la segregación de etileno en los tejidos, ya que se conoce que los jasmónidos influyen en la producción de etileno y viceversa. Al tratar los tejidos con el ester metílico del ácido jasmónico la expresión de los genes que codifican la fenilalanina-amonioliasa y la cintaza de calcona, las cuales están involucradas en la formación de fitoalexinas (Saniewski, 1995, Cvikrová *et al.*, 2003) aplicaron etefon a alfalfa y aumentó la concentración de etileno exógeno en las células embriogénicas e indujo cambios en el metabolismo de sustancias fenólicas y en la actividad de la peroxidasa. También hubo un incremento en la actividad de la PAL sobre el nivel básico y fue acompañada por una acumulación elevada de los ácidos fenólicos.

Hubo la incorporación de la mayoría de los ácidos fenólicos nuevamente sintetizados en las fracciones de glucósidos y esteres para la zona de la pared celular. La actividad creciente de peroxidasa limitada a pared celular después de la aplicación del etefon se

correlaciono con la incorporación pronunciada del etileno exógeno no e influencio el crecimiento del cultivo de embriones mas avanzados ni alteró significativamente el metabolismo del fenilpropanoide.

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

Las funciones de las fitoalexinas y fitoalexinas terpénicas en la resistencia parecen bastante prometedoras. Sin embargo, en síntesis acelerada inhibe el crecimiento de la hifa del hongo, pero no los niveles de esporulación del mismo, además, los niveles de fitoalexinas en interacciones compatibles son muy bajos y por tanto incapaces de afectar el desarrollo del hongo, cosa que no ocurre en interacciones incompatibles. Por tanto este tipo de resistencia podría ser interpretada como vertical, ya que aparentemente responde a interacciones del tipo gen por gen, aunque a la fecha se conocen tres factores genéticos que regulan la expresión de las proteínas responsables de la síntesis de estos compuestos y su carácter cuantitativo. Además las plantas contienen comúnmente no una fitoalexina sino todo un complejo de estas, lo que hace aún más eficaz la defensa contra los patógenos (Fig. 1), esto puede explicar porque las fitoalexinas tienen un amplio espectro de actividad (Jankiewicz y Sobiczewski, 2003).

Las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa son oxidoreductasas de gran importancia en productos vegetales no solamente por el papel que juegan en el deterioro de productos agrícolas cosechados sino también por su participación en otros procesos de los vegetales tales como en la síntesis de lignina, en la oxidación del AIA y su papel en aspectos fitopatológicos relacionado con resistencia a enfermedades.

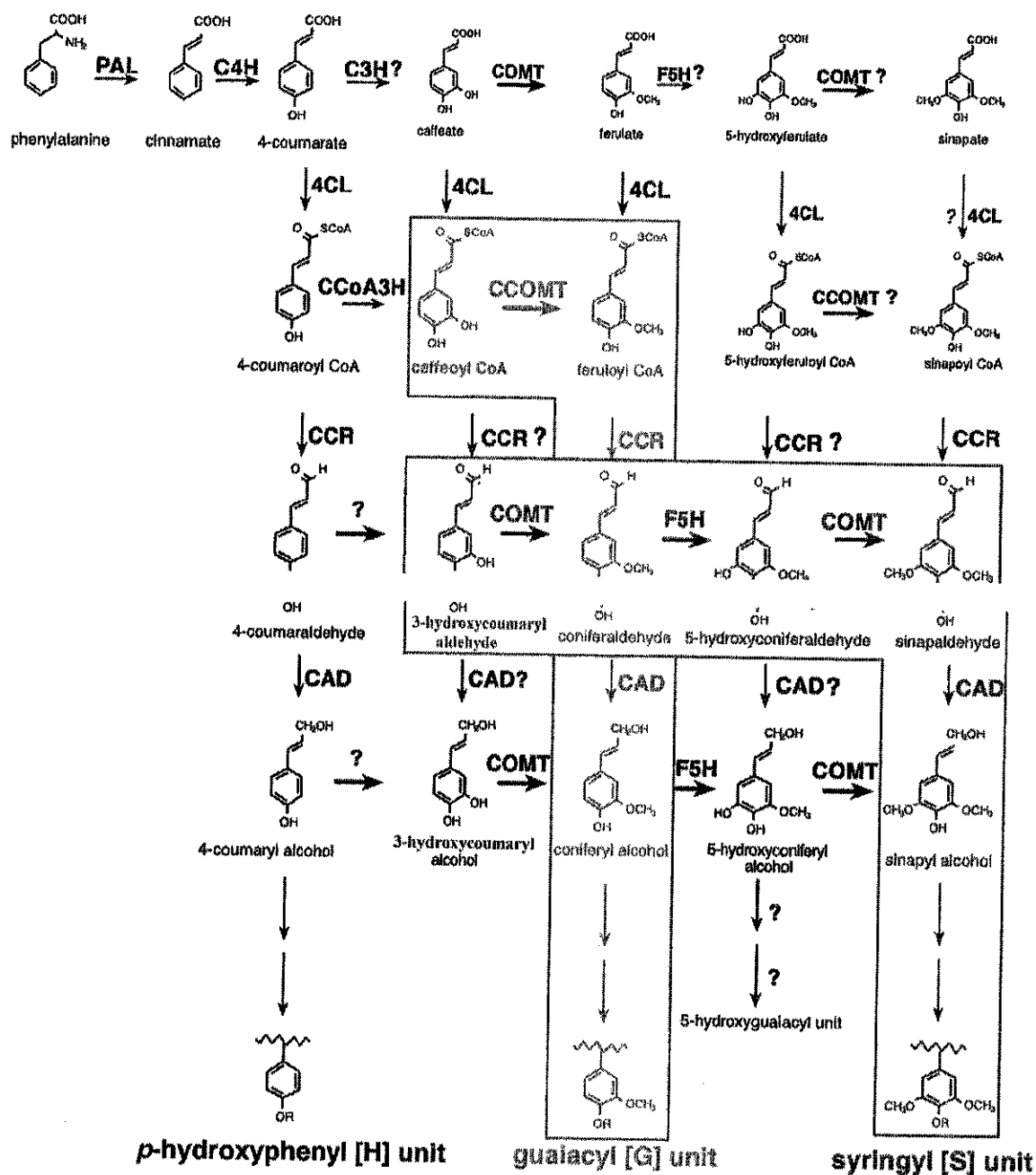


Figura 1. Rutas biosintéticas fenilpropanoide y de los monolignoles. Las reacciones en verde parecen las más probables para la ruta *in vivo* de las ligninas de tipo guaiacilo. Las reacciones en rojo representan aquellas reacciones para las cuales hay evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de estar implicadas en la biosíntesis específica de unidades sirigilo. El intermediario de color naranja es común a las rutas de ligninas G y S. CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; 4CL: 4-cumarato:CoA ligasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; CCoMT: cafeoil-CoA-O-metiltransferasa.

### 3.5. Peroxidasas (EC.1.11.1.7, POX)

Las peroxidasas ( $H_2O_2$ : donador de hidrógeno:  $H_2O_2$  oxidorreductasas) son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoeléctrica de diferentes sustratos a expensas del  $H_2O_2$ :  $2RH + H_2O_2 \rightarrow 2R + 2H_2O$ . Se encuentran ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal: Rodófitos (Collen *et al.*, 1994), Clorófitos (Vanden Driessche *et al.*, 1984; Weger, 1997), Briófitos (Matlok *et al.*, 1989), Pteridófitos (Bakardjieva *et al.*, 1996) y en todos los Espermatófitos estudiados (Siegel, 1993); incluso aparecen en Euglenófitos, pertenecientes al Reino Protozoo.

Las peroxidasas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia no relacionada estructuralmente con la anterior constituida por las peroxidasas animales (Welinder 1992, Hiraga *et al.*, 2001). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas se han definido tres clases en base a las diferencias estructurales que existen entre ellas:

- Clase I: está compuesta por la citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores y las peroxidasas bacterianas (Jespersen *et al.*, 1997). No poseen naturaleza glicoproteica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol, y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. Adicionalmente, estas peroxidasas de la clase I son inhibidas por reactivos del grupo tiol como el *p*-cloromercurobenzoato y, en general, son consideradas como muy termolábiles.
- Clase II: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas de secreción (manganeso peroxidasas).
- Clase III: contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción y muestran características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoproteica, están localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares. Estas peroxidasas muestran una baja especificidad de sustrato, con una moderada, pero notable, afinidad por el

alcohol coniferílico, además de presentar una inusual estabilidad térmica. Todas estas características las distinguen de las ascorbato peroxidasas vegetales (clase I).

### 3.5.1. Naturaleza y estructura

Las peroxidasas vegetales de secreción son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 28 y 60 kDa (Hiraga *et al.*, 2001). Contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX (hemo b). En su estado nativo, el átomo de hierro se encuentra en el estado de oxidación formal +3 [Fe(III)]. Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína, que se ha conservado durante la evolución. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro (Banci, 1997). El grupo prostético (Figura 2) resulta esencial para la actividad enzimática ya que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima.

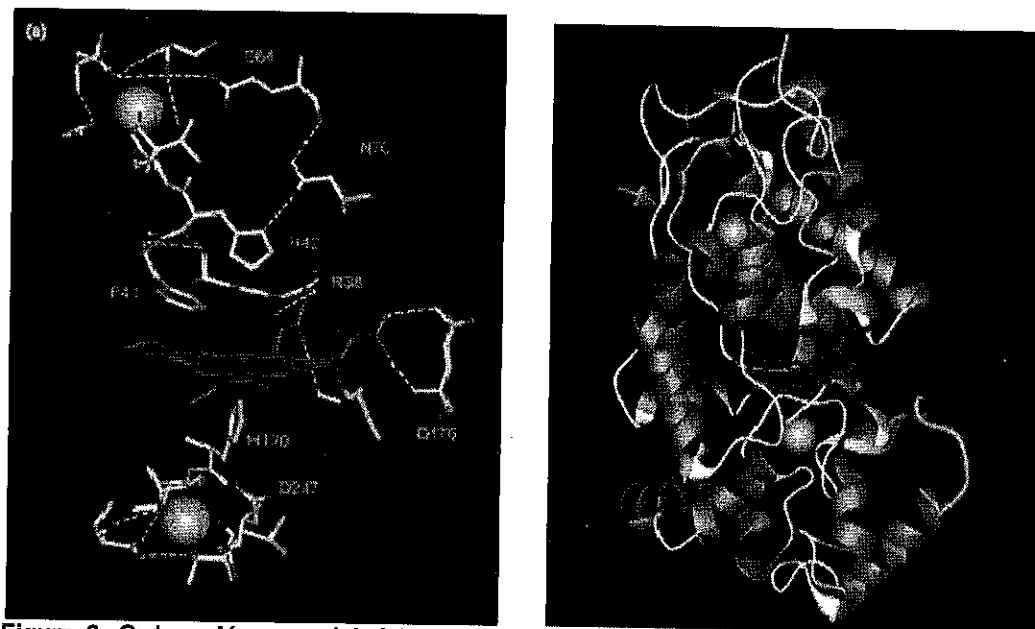


Figura 2. Ordenación espacial del centro activo de las peroxidasas. El grupo hemo (en rojo) está coordinado por la histidina proximal, H170, y el sexto sitio de coordinación está vacante (a). Estructura tridimensional de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRPC); las regiones plegadas helicoidalmente se muestran en púrpura, y las láminas- $\beta$  en amarillo (b). El grupo hemo se encuentra entre los dominios distal (arriba) y proximal (abajo) de la enzima. Los dos sitios de unión al calcio se muestran como esferas azules. (Vitale, 1999).

En su estructura tridimensional tienen 10 hélices  $\alpha$  y algunas láminas  $\beta$ . El grupo hemo está localizado en una cavidad entre dos hélices  $\alpha$  antiparalelas. Hay residuos conservados que tienen un papel importante, como la histidina distal y la arginina adyacente; y la histidina proximal y el hidrógeno unido al ácido aspártico.

En todas las peroxidasas de clase III conocidas hasta el momento se encuentran dos átomos estabilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de tener estos efectos estabilizadores sobre la estructura plegada, el  $\text{Ca}^{2+}$  también es considerado un activador de las peroxidasas vegetales de secreción (Converso y Fernández, 1996). Las cadenas a las que están unidos están altamente conservadas (Welinder *et al.*, 1992).

La glicosilación de la enzima varía entre el 0 y el 25 %, siendo los principales azúcares la N-acetilglucosamina, la manosa, la fucosa y la xilosa. La mayoría de los oligosacáridos tienen un alto contenido en manosa (Gray *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1996). La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan las hélices, de tal forma que el glicano se presenta hacia el exterior de la molécula (Veitch, 2004). La glicosilación es uno de los factores principales que determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales de secreción (McEldoon y Dordrick, 1996) ya que la eliminación de estos oligosacáridos normalmente afecta la cinética de las peroxidasas, su estabilidad térmica, su resistencia a las proteasas (por ejemplo tripsina), su estructura secundaria, y sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero *et al.*, 1994, Tams y Welinder, 1995; Duarte-Vázquez *et al.*, 2003).

Otros elementos estructurales importantes son los cuatro puentes disulfuro ligados a los pares de residuos invariables de cisteína y un puente salino importante para la unión entre los dominios N- y C- terminal, en los residuos invariables de Asp y Arg (Veitch, 2004).

### **3. 5. 2. Funciones**

Las peroxidasas pueden considerarse como enzimas bifuncionales, ya que oxidan varios sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, pero también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo) (Passardi *et al.*, 2005). Su implicación en procesos fisiológicos y de desarrollo puede detectarse desde la germinación hasta la senescencia. Participan en la



germinación (Bellani *et al.*, 2002), crecimiento celular (Cosgrove 2001), metabolismo de hormonas (Grambow y Langenbeck-Schwich, 1983), defensa frente a patógenos (Kristensen *et al.*, 1999), suberización (Bernards *et al.*, 1999), polimerización de extensinas (Brownleader *et al.*, 1995), dimerización de ferulatos (Ikegawa *et al.*, 1996), oxidación de fenoles (Lagrimini, 1991) y especialmente en la lignificación.

### 3.5.3. Polimorfismo

La principal razón en la dificultad de asignar una función específica a una peroxidasa en particular ha sido la alta redundancia encontrada en los genes de las peroxidasas, el amplio espectro de sustratos susceptibles de ser oxidados y las propiedades inmunológicas muy similares de las diferentes isoenzimas (Christensen *et al.*, 1998)

Las peroxidasas vegetales de secreción son un grupo de enzimas que muestran un alto grado de polimorfismo, cuya extensión puede ser fácilmente estudiada mediante enfoque isoeléctrico. De acuerdo con su punto isoeléctrico (pH), las isoenzimas de la peroxidasa se clasifican en ácidas ( $pI < 7.0$ ), moderadamente básicas ( $7.0 > pI < 9.0$ ) o fuertemente básicas ( $pI > 9.0$ ) (Ros Barceló, 1997; Ros Barceló y Pomar, 2001, Quiroga *et al.*, 2000). Estos distintos grupos muestran una diferente localización subcelular pero una especificidad de sustrato similar.

Las peroxidasas vegetales de clase III están codificadas por una gran familia multigénica (Hiraga *et al.*, 2000) y además, estas enzimas muestran un alto grado de polimorfismo. En la mayoría de los casos, el polimorfismo varía con el cultivar y con el órgano de la planta. En las plantas superiores se han encontrado entre 8 y 15 familias de peroxidasas, algunas de las cuales contienen dos o tres genes muy similares (Welinder, 1992). En rábano se han secuenciado nueve genes distintos que comparten entre el 50-95 % de homología. Sin embargo, la resolución de isoenzimas de la peroxidasa de rábano por isoelectroenfoque revela la existencia de 42 isoenzimas (Hoyle, 1977). Esto indica que más de una de las posibles isoenzimas determinadas por isoelectroenfoque pueden originarse a partir de un mismo gen, de modo que su origen debe radicar en los diferentes patrones de glicosilación resultantes de las modificaciones post-transcripcionales (Green y Oliver, 1991). Otra fuente de polimorfismo y heterogeneidad puede provenir de las modificaciones covalentes o alteraciones conformacionales, incluyendo alteraciones

alostéricas con componentes de bajo peso molecular, por ejemplo los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló *et al.*, 1987). Estas interacciones también pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz, 1989), ampliando así su papel metabólico.

Desde la aparición de las peroxidasas de clase III, justo después de la colonización del medio terrestre, hasta las angiospermas, el número de copias génicas se ha incrementado mucho. Esto puede relacionarse con la adaptación de las plantas a la vida terrestre en la presencia de elevadas concentraciones de oxígeno. La evolución de una familia multigénica parece estar relacionada con el aumento de la complejidad de las plantas y con la diversificación de sus biotopos y patógenos (Passardi *et al.*, 2004). En algunas plantas, una alta tasa de duplicación ha llevado a grandes familias multigénicas, como sugiere la presencia de 138 genes que codifican peroxidasas en *Oryza sativa*, o los 73 de *Arabidopsis thaliana* (Tognolli *et al.*, 2002). Estos 73 genes de *A. thaliana* se han usado para determinar relaciones filogenéticas entre las peroxidasas del reino vegetal (Duroux y Welinder, 2003). Estos estudios parecen indicar que las peroxidasas de clase III aparecieron con la colonización de la tierra por parte de las plantas.

#### **3. 5. 4. Localización tisular y subcelular**

Probablemente, para compensar su amplia especificidad de sustrato, la peroxidasa es una enzima que presenta una compartimentalización tisular muy específica. Así, la peroxidasa está localizada en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur *et al.*, 1997), en las células epidérmicas (Goldberg *et al.*, 1987) y vasculares (Czaninski y Catesson, 1969; Ros Barceló *et al.*, 2002). En las células vasculares, la peroxidasa puede estar localizada en el xilema (Ferrer y Ros Barceló, 1994) y, secundariamente, en las células del cambium y del floema. En los frutos, la peroxidasa está fundamentalmente localizada en las células epidérmicas y del xilema (Calderón *et al.*, 1993); y en las hojas, la peroxidasa también está compartimentalizada en las células del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló, 1997).

En todos estos tejidos, la peroxidasa se encuentra localizada tanto en las paredes celulares como en las vacuolas. Sin embargo, en las células meristemáticas (Crevecoeur *et al.*, 1997), cambiales (Ros Barceló *et al.*, 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros

Barceló, 1997), las peroxidasas están principalmente localizadas en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur *et al.*, 1997) o bien firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló *et al.*, 1991, Sottomayor y Ros Barceló, 1997). Esta situación es ligeramente diferente en las células epidérmicas y del xilema, donde la peroxidasa está localizada principalmente en las paredes celulares, tanto en las paredes celulares primarias (Goldberg *et al.*, 1987), fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y la lámina media, como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló 1995, Ros Barceló *et al.*, 2002); siendo las pectinas uno de los factores que contribuyen a la distribución específica de las diferentes isoenzimas de la peroxidasa en los diferentes dominios de la pared celular (Ros Barceló *et al.*, 1988). Estas particularidades también conciernen a la compartimentalización de las isoenzimas de la peroxidasa. De hecho, cabe resaltar que, mientras que el espectro completo de peroxidasas (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, en las vacuolas sólo hay peroxidasas fuertemente básicas (Pedreño *et al.*, 1993). Esto indica que en la biosíntesis y recambio de los metabolitos secundarios como los fenoles y los alcaloides, que se compartimentalizan principalmente en la vacuola, están implicadas sólo las peroxidasas básicas (Pedreño *et al.*, 1993, Ros Barceló *et al.*, 1997), mientras que en la biosíntesis de las ligninas y los entrecruzamientos de la extensina y de los grupos feruloilo de las pectinas (reacciones que tienen lugar en las paredes de la célula vegetal) están implicadas los dos tipos de peroxidasas.

### **3. 5. 5. Papel fisiológico en la lignificación**

Aunque en un principio puede considerarse que las peroxidasas son las candidatas más adecuadas para realizar el proceso de polimerización de los alcoholes cinamílicos, diversos estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de la peroxidasa no viene acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini *et al.*, 1997), y arrojan ciertas dudas sobre la participación exclusiva de las peroxidasas ácidas en este proceso.

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes cinamílicos es la de presentar una correlación cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente

descrita en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles, 1991), en fibras de lino (McDougall, 1992), en álamo (Baier *et al.*, 1993), en agujas de picea noruega (Polle *et al.*, 1994) y en células en suspensión de *Zinnia* durante la diferenciación en traqueidas (Sato *et al.*, 1995). Sin embargo, en ninguno de los casos anteriormente citados ha sido una sola peroxidasa, ya sea básica o ácida, la única implicada en esas correlaciones. De todos estos estudios se desprende la conclusión de que más de una isoenzima parece estar implicada en la polimerización de los alcoholes cinamílicos.

Estos estudios podrían explicar por qué la reducción en la expresión de una isoenzima de peroxidasa individual no está acompañada por una reducción en la lignificación de la pared celular.

Este hecho, más que una desventaja, podría ser una ventaja ya que la aparente redundancia en la función biológica mostrada por las isoenzimas de la peroxidasa podría ser la causa de la heterogeneidad mostrada por las ligninas dentro de las diferentes áreas de la pared celular (Ros Barceló, 1997).

Las distintas isoenzimas de la peroxidasa pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes cinamílicos. Cuando se estudian las afinidades de varias peroxidasas básicas aisladas de tejidos lignificantes por los alcoholes cinamílicos, se observan valores de  $K_M$  del orden de 10-400  $\mu M$  (Takahama 1993; Ros Barceló, 1998). Estos valores de  $K_M$ , mostrados por las peroxidasas, son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao *et al.*, 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500  $\mu M$ ) de los valores de afinidad mostrados por las enzimas precedentes en la ruta biosintética (Grisebach, 1981). En este punto, no se debe olvidar que los valores de  $K_M$  de las peroxidasas con respecto al alcohol coniferílico presentan una cierta dependencia de la concentración de  $H_2O_2$ , siendo proporcionalmente menor al descender la concentración de  $H_2O_2$  (Ros Barceló, 1998). De hecho, los valores de  $K_M$  mostrados para el  $H_2O_2$  por muchas peroxidasas, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160  $\mu M$  (Takahama, 1993; Ros Barceló, 1998), sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de  $H_2O_2$ .

Debido a la necesidad que tienen las peroxidasas del  $H_2O_2$  para su actuación, es lógico pensar que para que las peroxidasas tuvieran un papel activo en la lignificación de la pared celular, no sólo es indispensable que éstas se encuentren localizadas en las mismas áreas de la pared celular que lignifica, sino que también es necesario que, en ellas, las peroxidasas permanezcan activas. Por ello, es conveniente, aunque no indispensable (Ferrer *et al.*, 1990), que dichas áreas de la pared celular muestren una producción de  $H_2O_2$  con el fin de favorecer la actividad de las peroxidasas. En este sentido, se ha de mencionar el trabajo de Nose *et al.*, (1995), donde se ha descrito que agentes secuestradores del  $H_2O_2$  inhiben la lignificación de suspensiones celulares de *Pinus taeda*, datos que refuerzan la idea de que la síntesis de ligninas es totalmente dependiente de la producción de  $H_2O_2$ , pudiendo tener éste, en cierta medida, un papel regulador. El mayor dilema que persiste hoy día se refiere al mecanismo a través del cual se genera el  $H_2O_2$  necesario para activar a las peroxidasas durante la oxidación de los alcoholes cinamílicos. Diferentes estudios parecen apuntar la idea de que dicho sistema generador de  $H_2O_2$  estaría localizado a nivel de la membrana plasmática e implicaría a una NAD(P)H oxidasa que usaría NADPH citoplasmático (Ros Barceló, 1998; Ogawa *et al.*, 1997).

### **3. 6. Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL) y Fenoles**

Una enzima que por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor en los tejidos enfermos es la fenilalanina amonio-liasa (PAL), que es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Goodman, *et al.*, 1986). Way *et al.*, (2002) al trabajar con tabaco transgénico encontraron que la fenilalanina amonio- liasa tiene un importante papel en la resitencia de las plantas. Esta enzima cataliza la conversión de L- fenilalanina-amonio-liasa a ácido trans-cinámico que es el primer paso de la ruta de fenilpropanoide, que provee los precursores de los pigmentos flavonoides, lignina, los protectores UV, y las fitoalexinas furanocoumarinas (Lewis y Yamamoto, 1990). El metabolismo fenilpropanoide, se activa en respuesta a una amplia gama de desarrollo y las señales ambientales, y por lo tanto, los fenilpropanoides sintetizan durante el proceso normal de desarrollo y bajo condiciones de estrés como irradiación UV, daño mecánico o ataque del patógeno (Lawton y Lamb, 1987; Dixon y Lamb, 1990). Se sabe también que los fenilpropanoides pueden actuar como señales

moleculares en procesos de reconocimiento entre *Agrobacterium* y *Rhizobium* y sus plantas hospederas (Lynn y Chang, 1990). La fluctuación en la actividad PAL se ha demostrado por ser un elemento clave que controla la síntesis de fenilpropanoides y aumenta la cantidad de ARNm en base al incremento de la actividad PAL (Edwards *et al.*, 1985; Fritzemeier *et al.*, 1987; Lawton y Lamb, 1987).

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

En células de pino, la inducción de la actividad PAL ocurre simultáneamente con el incremento de las actividades de enzimas específicas de lignina, seguido por la disposición de la lignina en las paredes de la célula (Campbell y Ellis, 1992). La actividad PAL y de otras enzimas de la ruta fenilpropanoide también se estimula altamente en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en hojas hipersensibles al virus del mosaico del tabaco (VMT). La activación del metabolismo fenilpropanoide da lugar a la deposición de polímeros fenólicos acumulando nuevas barreras mecánicas contra la invasión del patógeno (Favali *et al.*, 1978). Entre las enzimas del tabaco implicadas en el metabolismo fenilpropanoide, esta la OMTs (O-metiltransferasa) de la clase I y II y la alcohol cinnamil deshidrogenasa. Duroux y Welinder (2003) mencionan que el aumento en la respuesta de defensa abarca la acumulación de cinco genes de defensa relacionados ( $\beta$ -1-3-Glucanasa B2 y A1, Quitinasa B3 y A2, y Fenilalanina amonio-lasa) y la elicitación temprana en el aumento del peróxido de hidrógeno. En cebada, el RNAm de la PAL indicaron que el nivel del mensaje comenzó a aumentar en 0.5 h después de la inoculación con *Erysiphe graminis* f.sp. hordei y *Erysiphe pisi* (Shiraishi *et al.*, 1995).

### 3.7. Superoxido Dismutasa (.15.1.1. SOD)

La enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD,) constituye una de las defensas primarias de las células frente al estrés oxidativo. La familia de las SODs está compuesta por metaloproteínas que catalizan la reacción de dismutación del radical superóxido a  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Existen tres tipos de SODs según el cofactor metálico en el sitio activo; MnSOD, FeSOD y CuZnSOD. Estas tres SODs presentan diferentes propiedades moleculares, incluyendo diferente sensibilidad a inhibidores, y se encuentran localizadas en distintos compartimentos subcelulares. Así, las MnSODs (resistentes a KCN y  $H_2O_2$ ) se encuentran en la matriz mitocondrial, peroxisomas y bacteroides; las CuZnSODs (sensibles a KCN y  $H_2O_2$ ) se localizan principalmente en el citosol y cloroplastos; y las FeSODs (resistentes a KCN y sensibles a  $H_2O_2$ ) se han detectado en el estroma cloroplástico (Bowler *et al.*, 1994).

Numerosos estudios demuestran que el estrés ambiental tiene un importante efecto sobre la expresión y actividad SOD en plantas (Bowler *et al.*, 1994). Condiciones adversas como la sequía, bajas temperaturas, anoxia y ataque por patógenos se han correlacionado con la actividad SOD (Monk *et al.*, 1989). También se ha observado aumentos en la actividad en respuesta al ozono, sin embargo se conoce muy poco sobre los mecanismos que controlan la expresión de la SOD en respuesta a factores ambientales.

Uno de los sistemas mas adecuados para estudiar la respuesta diferencial de las isoenzimas SOD al estrés, es la familia de genes *sod* de maíz (Scandalios, 1997). Este sistema esta constituido por al menos nueve isoenzimas diferenciables bioquímica y genéticamente. Por ejemplo, el tratamiento con etileno, una hormona cuya síntesis aumenta durante el estrés oxidativo, causa un incremento del mRNA y la proteína de la isoenzima Sod4 (citoplasmático), pero no afecta las isoenzimas Sod1 (cloroplástica), Sod2 (citoplasmática) y Sod3 (mitocondrial). Así mismo, se han observado respuestas distintas de las isoenzimas SOD tras el tratamiento de las plantas de maíz con  $H_2O_2$ , ácido abscísico y ácido salicílico. Estos datos sugieren que la percepción del estrés y la subsiguiente respuesta protectora de la SOD frente al daño oxidativo dependen del orgánulo celular primariamente afectado. Estudios similares en *Nicotiana glauca* utilizando sondas de cDNA de CuZnSOD (citoplasmática), FeSODs (cloroplástica) y MnSOD (mitocondrial) han

demostrado que el mRNA de la FeSODs aumenta cuando el estrés oxidativo implica mas directamente a los cloroplastos, mientras que la MnSOD responde a un estrés localizado principalmente en las mitocondrias (Tams *et al.*, 1995).

### **3.8. Defensa debida a la resistencia Sistémica Adquirida**

En las plantas, la resistencia inducida es el tipo de resistencia que aparece después de que las plantas han sido preinoculadas con varios agentes bióticos o previamente tratados con varios agentes químicos o físicos. La resistencia inducida es no específica debido a que, sin importar el tipo de agente o patógeno utilizado como inductor, el nivel de resistencia en la planta aumenta ante varios patógenos.

Esta inducción de resistencia a la enfermedad ha sido conocida por muchos años bajo diversos nombres tales como inmunidad fisiológica adquirida o resistencia sistémica inducida; actualmente se le conoce como Resistencia Sistemica Adquirida. La perspectiva es que la RSA es un componente integrado por un gran repertorio de resistencia a enfermedades de plantas (Ryals *et al.*, 1994).

Por ejemplo, la infección que causa el virus del mosaico del tabaco en plantas de tabaco hipersensibles induce una resistencia sistémica ante este virus, así como ante otros virus, oomicetos (*Phytophthora*), bacterias (*Pseudomonas tabaci*) y áfidos.

En los últimos 30 años, la RSA se ha demostrado en muchas especies de plantas y el espectro de resistencia se ha ensanchado para incluir no solamente virus y bacterias, sino también muchos hongos fitopatógenos de importancia agronómica (Kozela, 2003).

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

El primer paso en el desarrollo del RSA es el reconocimiento de la infección del patógeno por la planta. Una vez que la planta reaccione al patógeno, se mandan las señales que accionan resistencia en lugares adyacentes así como tejidos distantes. Algo importante,



no todas las interacciones planta-patógeno conducen a la inducción de RSA. Las interacciones compatibles pueden conducir a la inducción del RSA; así el patógeno necesita inducir una reacción de resistencia gen por gen (Kosela, 2003).

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

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

### **3.9. Modo de Acción de los Fungicidas empleados.**

Los fungicidas constituyen el grupo mas numeroso y utilizado de productos químicos para el combate de enfermedades. De acuerdo a su movilidad en la planta, los fungicidas pueden ser de contacto (o residuales) o sistémicos. Los productos de contacto no penetran en la planta, sino que forman una capa protectora que impide la infección, ya sea matando al hongo o interfiriendo con los mecanismos de penetración. Debido a que permanecen sobre la superficie de la planta, estos productos deben ser un poco solubles en agua, para que no sean lavados por la lluvia, pero lo suficientemente solubles para ser absorbidos por las esporas, tubos germinativos o hifas. Deben poder resistir por varios días el efecto de la luz, el aire y las sustancias de la planta y el lavado por la lluvia, de estas propiedades depende el poder residual del fungicida.

Los productos sistémicos penetran en la planta y se mueven en ella en grado diverso. Algunos solamente penetran la lámina foliar pero no se trasladan a otros sitios. Este tipo de movimiento se llama traslaminar. Otros pueden movilizarse a grandes distancias del punto de aplicación. Con la excepción del Fosetil-aluminio, que se mueve tanto en el floema como en el xilema (ambimóvil), la mayoría de los fungicidas sistémicos se mueven exclusivamente en el xilema (movimiento acrópeta). El transporte via xilema esta determinado por la gradiente de potencial hídrico entre el suelo y el aire, y éste a su vez depende de factores tales como la humedad relativa, la temperatura, la luz y la capacidad de transpiración de los tejidos. El movimiento via floema, depende del estado de

crecimiento de la planta. Debido a que penetran en la planta, los productos sistémicos deben de ser altamente selectivos para evitar efectos fitotóxicos, esta alta selectividad, se basa en mecanismos de acción bioquímica muy específicos. En general los productos sistémicos son más caros que los de contacto, pero este hecho a menudo se compensan porque se usan en dosis mas bajas y a intervalos menos frecuentes, ya que no son fácilmente lavados, se movilizan hacia partes de la planta que van quedando desprotegidas con el crecimiento y muchos de ellos tienen efecto curativo. Por esta razón, el costo por area y por año a menudo es mejor con fungicidas sistémicos que con fungicidas de contacto.

De acuerdo con el momento de actividad en relación con el proceso de infección, los fungicidas pueden ser protectores, si su actividad se da antes de que el tejido sea invadido por el patógeno o terapéuticos o curativos, si actúan después de la invasión del tejido. Existen unos pocos fungicidas que si bien no eliminan el patógeno presente dentro del tejido, si destruyen las estructuras presentes en la superficie de la planta. Los fungicidas de este tipo, se denominan erradicantes. Estos tipos de actividad no son mutuamente excluyentes; un mismo fungicida puede actuar de forma protectora o terapéutica. Para que un fungicida tenga actividad terapéutica necesariamente debe de ser sistémico. De ahí que en lenguaje usual, el término sistémico y curativo se usen como sinónimos, aunque se refieren a fenómenos diferentes. De igual manera, dado que la gran mayoría de los fungicidas de contacto actúa en forma protectora (algunos son erradicantes), los términos fungicida de contacto y fungicida protector se usan comúnmente como sinónimos, aunque los conceptos a que se refiere son diferentes, la figura número 3, ilustra estas diferencias de concepto. La actividad curativa de un fungicida sobre una determinada enfermedad normalmente se da en los primeros estadios después de la infección. Después de cierto tiempo, a partir de la invasión de los tejidos, la aplicación de un fungicida, no logra detener en forma eficaz el avance del patógeno. El tiempo máximo entre la infección y la aplicación exitosa del fungicida no logra detener en forma eficaz el avance del patógeno. El tiempo máximo entre la infección y la aplicación exitosa del fungicida, se denomina periodo de actividad retroactiva o periodo de actividad posinfección. Este periodo varía con el fungicida, con la combinación patógeno-hospedante y con las condiciones que influyan sobre la absorción y el movimiento del fungicida.

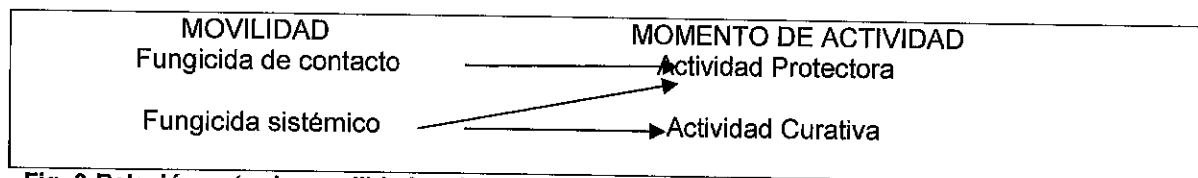


Fig. 3 Relación entre la movilidad en la planta de un fungicida y su momento de actividad en relación con el momento de invasión en los tejidos de la planta por parte del patógeno.

Los fungicidas pueden ser clasificados de acuerdo con su sitio de actividad bioquímica. El sitio de actividad bioquímica se refiere al punto del metabolismo del patógeno en el cual actúa el fungicida. El modo de acción se refiere al proceso general afectado (Cuadro 1), y el mecanismo de acción a la forma específica, a nivel bioquímico, en que ese proceso general es afectado. De esta manera, los fungicidas se pueden clasificar tan específicamente como se quisiera, pero sobresalen por sus mecanismos tres grupos generales: a) inhibidores específicos, los cuales actúan en un solo o pocos puntos del metabolismo del patógeno, b) Inhibidores multisitio, los cuales actúan en muchos puntos del metabolismo y c) Productos que interfieren en la patogénesis, los cuales no son tóxicos al patógeno pero interfieren con sus mecanismos de patogénesis, o mejoran la resistencia del hospedante.

Cuadro 1A. Modos de Acción de los Fungicidas

| Proceso Afectado                                                     | Grupo de Fungicidas                                                     |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Respiración y otros procesos enzimáticos generales                   | Ditiocarbamatos<br>Clorotalonil<br>ftalimidas                           |
| Respiración (pasos metabólicos específicos)                          | Dicarboximidas<br>Oxatiinas<br>B- metoxiacrilatos                       |
| Síntesis Proteica (Síntesis de ARN)                                  | fenilamidas                                                             |
| Metabolismo de aminoácidos                                           | Fosetil-Aluminio                                                        |
| División celular (formación del huso acromático)                     | Benzimidazoles                                                          |
| Formación de la pared celular                                        | Dimethomorph<br>Organofosforados                                        |
| Síntesis de ergosterol<br>desmetilación                              | Piperazinas, piridinas, pirimidinas, imidazoles,<br>triazoles, morfina. |
| Penetración del Hospedante<br>Melanización<br>Producción de cutinasa | Triciclazol<br>Organofosforados                                         |
| Activación de mecanismos de defensa                                  | Fosetil-Aluminio                                                        |

### 3.9.1. Inhibidores de la Respiración

Estos son fungicidas de amplio espectro que inhiben selectiva y específicamente la respiración de los hongos sin causar toxicidad en la planta. Muestran actividad sobre diferentes especies de ascomicetes, basidiomicetes, deuteromicetes y oomicetes. El

principal grupo dentro de los inhibidores de la respiración es el de los fungicidas análogos de la estrobirulina, llamados también  $\beta$ -metoxiacrilatos. La estrobirulina es un fungicida natural derivado del basidiomicete *Strobilurus tenacellus* varios fungicidas con estructuras químicas similares y con idéntico mecanismo de acción han sido sintetizados, entre ellos la axosistrobina y el pyraclostrobin, el Boscalid es derivado de la familia de las anilidas, otro compuesto químico que inhibe la respiración.

### **3.9.2. Fungicidas para Oomicetes**

Existen varios tipos de fungicidas desarrollados específicamente contra el combate de oomicetes, el mayor grupo de fungicidas para oomicetes lo constituyen las fenilamidas, las cuales son altamente eficaces e incluyen, entre otros al metalaxil, benalaxil, y oxadixil. Estos fungicidas se formulan tanto para uso en follaje como para la aplicación en suelo.

El Foseti-Aluminio, es el único fungicida ambimóvil. Aplicado al follaje es transportado vía floema a las raíces. Su principal uso es para los oomicetes que atacan la raíz donde es altamente eficaz, aunque también ataca algunos oomicetes del follaje, en general es menos eficaz que las fenilamidas en este aspecto. La actividad es ejercida por su metabolito, el ácido fosforoso. La actividad primaria es una toxicidad directa sobre el oomicete, la cual lleva a inhibición del crecimiento. Esto a su vez permite que los mecanismos de defensa de la planta susceptible sean activados, considerándose esto como un mecanismo secundario de actividad.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Localización del experimento**

La presente investigación se llevó a cabo durante el verano de 2007 en los campos experimentales del PICTIPAPA (Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa) en ICAMEX, Metepec Estado de México y en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en Chapingo, Estado de México.

### **4.2. Material Vegetal**

Variedad comercial Alpha que presenta susceptibilidad y mediana resistencia al ataque de *Phytophthora infestans*.

### **4.3. Diseño experimental y tratamientos**

La distribución de los tratamientos en el campo consistió en unidades experimentales de un surco de 5 metros de largo con 15 plantas cada uno y cuatro repeticiones, con el fin de facilitar la aplicación de los productos, y de disminuir las probabilidades de dispersión, los tratamientos se distribuyeron de acuerdo al diagrama mostrado en la figura 4 y se observaron en campo de acuerdo a la figura 5 y 6 (Apendice 3) , en donde las repeticiones I y II fueron las primeras 15 plantas de cada surco, y las III y IV las otras 15 (individuos del 16 al 30). Los testigos, tratamientos 5 y 10, fueron plantas que no recibieron aplicación de los productos. El análisis de varianza se hizo asumiendo una distribución al azar.

Los diferentes tratamientos químicos previos a la siembra, son los siguientes fungicidas:

| Surcos | FUNGICIDAS    | Concentración             | Dosis    |
|--------|---------------|---------------------------|----------|
| 1      | AMISTAR®      | Azoxystrobin 50%          | 5g/L     |
| 2      | AMISTAR®      | Azoxystrobin 50%          | 5g/L     |
| 3      | CABRIO-C®     | Boscalid + pyraclostrobin | 12.5 g/L |
| 4      | CABRIO-C®     | Boscalid + pyraclostrobin | 12.5 g/L |
| 5      | CABRIO 20 EG® | pyraclostrobin            | 1 ml/L   |
| 6      | CABRIO 20 EG® | pyraclostrobin            | 1 ml/L   |
| 7      | ALIETTE®      | Fosetil - Al              | 6 g/L    |
| 8      | ALIETTE®      | Fosetil - Al              | 6 g/L    |
| 9      | TESTIGO       |                           |          |
| 10     | TESTIGO       |                           |          |
| 11     | SIN SEMBRAR   |                           |          |
| 12     | SIN SEMBRAR   |                           |          |
| 13     | AMISTAR®      | Azoxystrobin 50%          | 5 g/L    |
| 14     | AMISTAR®      | Azoxystrobin 50%          | 5 g/L    |
| 15     | CABRIO-C®     | Boscalid + pyraclostrobin | 12.5 g/L |
| 16     | CABRIO-C®     | Boscalid + pyraclostrobin | 12.5 g/L |
| 17     | CABRIO 20 EG® | pyraclostrobin            | 1 ml/L   |
| 18     | CABRIO 20 EG® | pyraclostrobin            | 1 ml/L   |
| 19     | ALIETTE®      | Fosetil - Al              | 6 g/L    |
| 20     | ALIETTE®      | Fosetil - Al              | 6 g/L    |
| 21     | TESTIGO       |                           |          |
| 22     | TESTIGO       |                           |          |

A los 30 días después de la siembra, a las plantas de los surcos 1 a 10, se les hizo una aspersión al follaje con el mismo producto y dosis 30 días después de la siembra.

A partir de las 5 semanas después de la siembra, se realizaron lecturas semanales de tizón de acuerdo a la escala de Henfling (1987) (Apendice 4). Se realizaron muestreos de folíolos al azar, tomando 20 g de la planta en total de cada tratamiento y se llevaron al laboratorio para su análisis, manteniéndolos a una temperatura aproximada de 4°C. Este procedimiento se repitió de la semana 5a a la 10 semana, siendo un total de cinco muestreos tomando. Las variables evaluadas fueron porcentaje de infección de la enfermedad (tizón tardío, infección natural), actividad enzimática de Fenoles, Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX), Fenilalanina amonio-liasas (EC4.3.1.5 PAL) y Superóxido dismutasa (1.15.1.1. SOD).

| TRAT. | SURCO | REPETICIONES I, II | REPETICIONES III, IV |
|-------|-------|--------------------|----------------------|
| 1     | 1     | Plantas 1-15       | Plantas 16-30        |
| 2     | 2     |                    |                      |
|       | 3     |                    |                      |
| 3     | 4     |                    |                      |
|       | 5     |                    |                      |
| 4     | 6     |                    |                      |
|       | 7     |                    |                      |
| 5     | 8     |                    |                      |
|       | 9     |                    |                      |
|       | 10    |                    |                      |
|       | 11    | SURCO LIBRE        |                      |
|       | 12    | SURCO LIBRE        |                      |
| 6     | 13    |                    |                      |
| 7     | 14    |                    |                      |
|       | 15    |                    |                      |
| 8     | 16    |                    |                      |
|       | 17    |                    |                      |
| 9     | 18    |                    |                      |
|       | 19    |                    |                      |
| 10    | 20    |                    |                      |
|       | 21    |                    |                      |
|       | 22    |                    |                      |

1a. Aplicación a la Siembra.

2a. Aplicación 30 días después.

Una sola aplicación a la Siembra.

Fig. 4. Diseño Experimental y Tratamientos

#### **4.4. Laboratorio**

Las determinaciones realizadas en el laboratorio se hicieron utilizando polvo de acetona el cual se obtuvo a partir de 20 g de hojas + 50 ml de acetona 100% (4°C) molidas en licuadora y filtradas al vacio descartándose la acetona. Este proceso se repitió dos veces más con el tejido, y se dejo secar a temperatura de laboratorio (18°C) y se almacenó a -4°C hasta el ensayo de las enzimas fenoles (FEN), peroxidasas (POX), fenilalanina amonioliasa (PAL) y súper oxido dismutasas (SOD) (Cornide *et al.*, 1994, Alia-Tejacal *et al.*, 2002, Martinez-Tellez y Lafuente, 1997; Lozoya *et al.*, 2006).

##### **4.4.1. Fenoles**

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

##### **4.4.2. Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX)**

La actividad de POX se determinó mediante la metodología descrita por Alia-Tejacal *et al.*, (2002). La enzima se extrajo a partir de 0.1 g de polvo de acetona con 5ml de Tris-HCl frio (pH 7.1) conteniendo 1% de polivinilpirrolidona. Se mezclaron en un homogeneizador de tejidos durante 50 segundos, posteriormente la mezcla se centrifugo por 20 min a 12,500 rpm a 4°C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo de acuerdo con Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: la mezcla del ensayo fue con un volumen total de 3 ml, 2.6 ml de amortiguador Tris-HCl (pH 7.1), 0.25 ml de guayacol 0.1 M, 0.1 ml de peróxido de hidrógeno 0.25% y 0.05 ml del sobrenadante. Se evaluó el cambio de absorbancia a los 30, 60, 120 y 180 segundos a 470 nm. La actividad enzimática se reporta como U g<sup>-1</sup>p. f. donde U= Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol min<sup>-1</sup> de tetraguayacol.

##### **4.4.3. Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)**

La PAL se extrajo por el método descrito por Martinez-Tellez y Lafuente, 1997. A partir de 0.1g de polvo de acetona con 5 ml de Borato de Sodio 0.1 M (pH 8.8) frio + 20 mM β-mercaptoetanol, mezclándose en el homogenizador de tejidos durante 50 segundos. A continuación se agitó la mezcla durante 20 min en baño con hielo (4°C), posteriormente se filtró usando embudo de plástico y malla de tela, enseguida se centrifugo a 12,500 rpm



a 4°C durante 20 minutos. Se extrajo el sobrenadante, la enzima se precipitó agregando 0.46 g de sulfato de amonio por cada mililitro del sobrenadante y se agitó durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugo nuevamente por 20 minutos a 12,500 rpm a 4°C. Se utilizó el precipitado y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se redisolvió agregando 5 ml de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8), siendo este el extracto final el que se usó para el ensayo. El ensayo enzimático se realizó de acuerdo con Arz y Grambow (1995). La mezcla para el ensayo consistió de 1.8 ml de Borato de Sodio 0.1M (pH 8.8), 0.9 ml del extracto final, preincubado a 40°C por 5 min. Posteriormente se agregaron 0.3ml de L-fenilalanina 100 mM y se midió la absorbancia a 290 nm. Simultáneamente se llevó a cabo el ensayo de una repetición de la muestra con 2.1 ml de Borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) y 0.9 ml del extracto final. Se evaluó el cambio de absorbancia en 2h a 290nm a luz ultravioleta, manteniendo la muestra a baño maría a 40°C. La actividad enzimática se reporta como  $U\ g^{-1}p.f.$  donde  $U = \Delta$  (absorbancia) a 290 nm/h.

#### **4.4.4. Superóxido dismutasa (1.15.1.1. SOD)**

El método utilizado fue el descrito por Beyer y Fridovich (1978). A partir de .1gr de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se agregaron 5ml de solución buffer fosfato .01 M pH 7.8 la cual debe estar en todo momento fría, se homogenizó inmediatamente, luego los tubos se colocaron en hielo al homogeneizar, se decantaron en tubos para centrifuga y se centrifugaron a 16500 rpm por 20 minutos a 4° centígrados, finalmente se sacaron las muestras y se colocaron a temperatura ambiente. En ausencia de luz se tomaron 3ml de solución buffer EDTA-metionina, NBT y triton, se colocaron en tubo de ensayo de rosca. Se agregaron .5ml de sobrenadante, se agitó, se adicionó rivo flavina, se volvió a agitar, se iluminó por 7 minutos con lámpara de luz fluorescente y se leyeron en el espectrofotómetro a 560 nm luz visible intensidad media.

El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante los programas SAS (Statistical Analysis System) y Excel. Se aplicaron análisis de comparaciones de medias y correlaciones.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Porcentaje de Infección

A pesar que los productos no son específicos contra el tizón (excepto Fosetil-Aluminio; Aliette ®), se observó disminución en la infección cuando se aplicaron a la semilla y al follaje alcanzando en la quinta semana porcentajes de infección para Azoxystrobin (Amistar®) de 76%, Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C ®) de 58%, Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®) de 73% y de Fosetil- Aluminio (Aliette ®) de 70% (fig. 5, Apendice 4). Destaca un ligero efecto residual de los tratamientos cuando solo se hicieron en la siembra con porcentajes de infección para Azoxystrobin (Amistar®) de 94.5%, Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C ®) de 94.3%, Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®) y Fosetil- Aluminio (Aliette ®) de 96.7% al compararlos con el testigo sin protección (100%), aunque finalmente las plantas sucumbieron a las enfermedades igual que el testigo (fig. 7, Apendice 4). Cabe señalar que durante el desarrollo del cultivo se presentaron condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo del patógeno (humedad relativa de 75-95% y una temperatura alrededor de los 15°C, Apéndice 2).

#### 5.2.1. Análisis Estadístico

Con respecto a las medias y el porcentaje de infección para los tratamientos al follaje y a la semilla, los tratamientos con CABRIO 20 EG ®, Aliette y Amistar (Cuadro 2) resultaron estadísticamente iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), mientras que el testigo (Cuadro 2) y el tratamiento con el fungicida Cabrio-C (Cuadro 2, Apendice 5) resultaron significativamente diferentes, con una  $R^2=0.973686$ .

Para los tratamientos aplicados únicamente a la semilla, los datos que corresponden a los tratamientos con Amistar, Cabrio-C, Aliette y CABRIO 20 EG ®, resultaron estadísticamente iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), mientras que el testigo (cuadro 2) resultó significativamente diferente, con una  $R^2=0.986014$ .

### 5.3. Observaciones en Campo

Las diferencias en los porcentajes que representan el avance de la infección por *Phytophthora infestans* que se mostraron semana a semana durante la duración del experimento en el verano del 2007, si corresponde con la epidemiología de este microorganismo y las condiciones climáticas presentadas en ese momento. La variedad medianamente susceptible Alpha, con fungicida en follaje y semilla, presentó valores altos

de infección terminando en la semana 5 entre 58% (para el fungicida Cabrio-C ®) y 76% (para el fungicida Amistar ®) de follaje dañado respectivamente, situación que coincide con los datos reportados por Lozoya y Hernandez (2001) quienes reportan valores del 10 al 80% de infección en el primer y sexto muestreo, debido a la severidad de incidencia del tizón tardío.

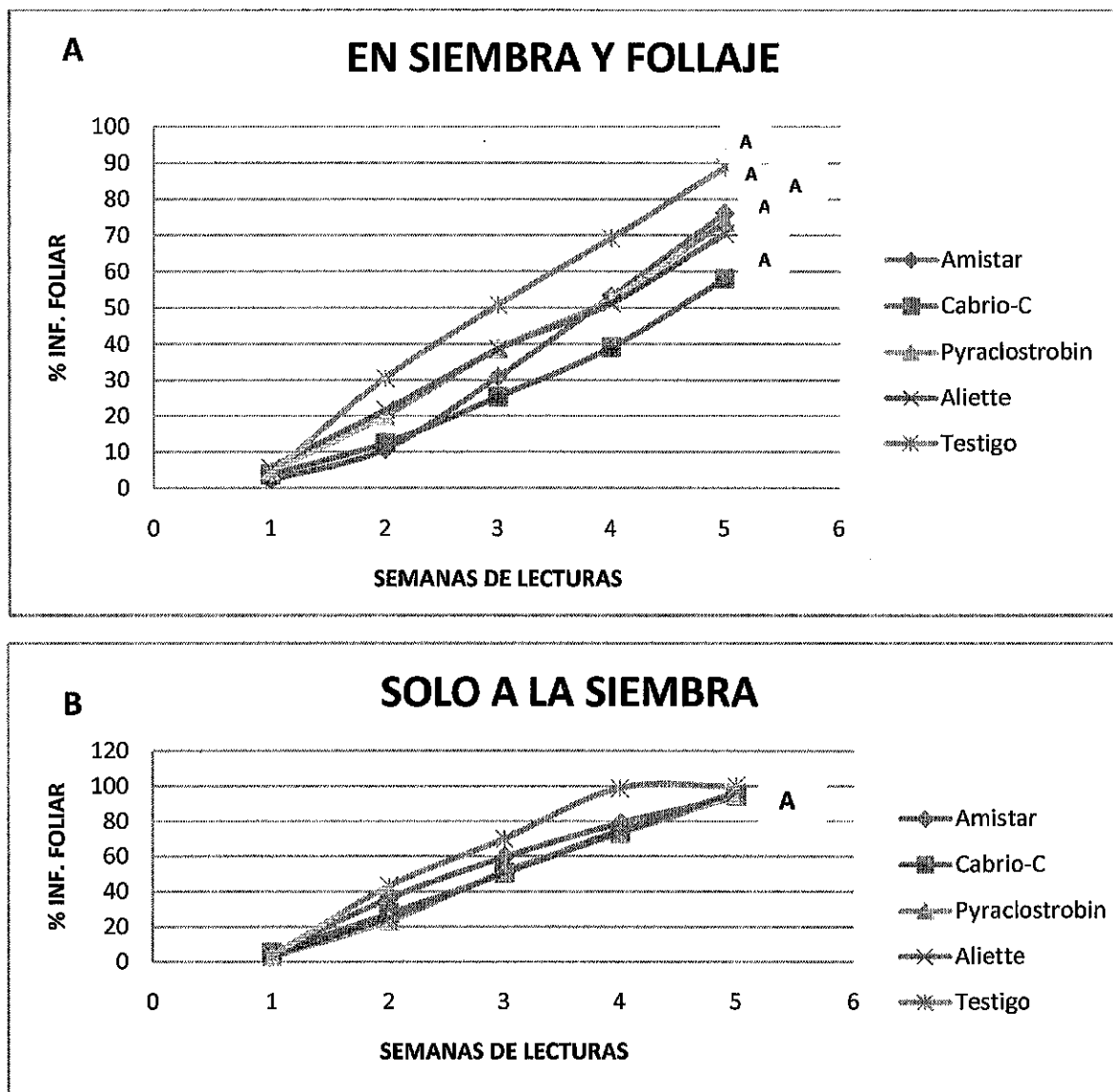


Fig. 5. Infección foliar por efecto de la aplicación de fungicidas sistémicos no específicos contra las enfermedades presentadas. A, aspersión de la semilla al momento de la siembra y al follaje 30 días. B, solo tratamiento a la semilla durante la siembra.

#### 5.4. Fenoles Totales

Se registró un aumento en el contenido de fenoles totales de acuerdo al aumento del porcentaje de infección en todos los tratamientos (Fig. 6 A y B). De acuerdo con Agrios (2001), los fenoles son de gran importancia y algunos se pueden acumular como fitoalexinas como resultado del ataque de microorganismos contribuyendo a la resistencia de enfermedades. Muchos fenoles y la oxidación de sus productos como las quinonas son altamente tóxicos al patógeno (Vidhyasekaran, 1988).

En los tratamientos con fungicida en semilla y follaje, los valores no representan diferencia significativa (prueba Tukey,  $P \leq 0.05$ ), aunque el mínimo valor se registra para el tratamiento con Azoxystrobin (Amistar®) de  $1.03624246 \text{ mg g}^{-1}$  de p. f. (p.f) y el máximo para el tratamiento Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C®) con  $2.85717327 \text{ mg g}^{-1}$  de p. f. (p.f) (Cuadro 2, Apendice 5).

En el tratamiento con Azoxystrobin (Amistar®) se presentó una infección foliar final del 76%, es por eso que corresponde al mínimo valor mostrado en las concentraciones de fenoles, en cuanto al porcentaje de infección foliar de Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C®), si fue menor alcanzando solo el 58%, que corresponde con las altas concentraciones de fenoles registradas en el estudio.

Para los tratamientos con fungicida en semilla, el valor mas bajo en concentración de fenoles en el muestreo de la semana 5 fue el del tratamiento de Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG®) de  $0.47062186 \text{ mg g}^{-1}$  de p. f. (p.f) cuya concentración corresponde a un nivel de infección foliar del 95% y el valor mas alto fue para el fungicida Azoxystrobin (Amistar®) en la semana 7 de  $3.2324567 \text{ mg g}^{-1}$  de p. f. (p.f), representando el 94% de infección, en cuanto al análisis estadístico se refiere, no presentó diferencia significativa entre los tratamientos (prueba Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Cabe señalar que únicamente, se realizaron 3 muestreos para la realización de esta prueba, dado que el follaje en la semana 8 y 9 era casi nulo o se encontraba muy dañado por la infección.

La alta concentración en fenoles probablemente, se debió a la alta infección por el tizón (60 a 95%) en ese tiempo, es probable que tal concentración de fenoles en si no haya sido suficiente para detener el ataque del oomiceto en esta variedad, aunque si se registraron aumentos en la concentración y las plantas que fueron protegidas a la semilla

y al follaje duraron 2 semanas mas que únicamente las que se protegieron a la semilla, no parecen ser significativos en el análisis estadístico (cuadro 2, Apendice 5).

En el 2000, Andreu, *et al.*, reportaron que la resistencia ocurre cuando una o mas fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno. En este sentido, los elicitores utilizados (tratamientos de fungicidas) si representaron de alguna manera ayuda al momento de la defensa de la planta ya que si se muestra diferencia entre los tratamientos dirigidos a la semilla y follaje y solamente a la semilla (Fig. 6 A1 y A2).

La resistencia de la planta a enfermedades de patógenos, depende a menudo de si la planta puede reconocer al patógeno temprano en el proceso de la infección. Esta resistencia en muchos casos se manifiesta por una restricción en la multiplicación y movimiento del patógeno, a una área pequeña alrededor del punto de infección. En esta parte aparece una lesión necrótica como respuesta de la planta a la infección (RH) que puede inducir la resistencia sistémica adquirida (RSA). También es importante el tipo de compuestos fenólicos formados como lo menciona Vidhyasekaran (1988), fenoles como las quinonas son altamente tóxicos al patógeno. También se encontró que la hidroquinona solo se encuentra en trigo resistentes mientras que en susceptibles solo identificaron ácido caféico.

Las concentraciones de fenoles presentadas en tratamientos a la semilla y al follaje y únicamente a la semilla fueron similares a través del tiempo, manteniendo una tendencia lineal para semilla y follaje (Fig. 6 A1y A2) y únicamente semilla.

Estas altas concentraciones y los efectos provocados en la infección foliar, puede ser atribuido a una mayor respuesta en la síntesis de fenoles por la aplicación de fungicidas los cuales aparentemente indujeron las síntesis de fitoalexinas y por lo tanto un aumento en la concentración de fenoles, sin embargo estos fenoles no resultan ser altamente tóxicos para el oomiceto. Existen algunos reportes donde la síntesis de fitoalexinas fue correlacionada con la aplicación de fungicidas como el metalaxyl usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* (Cahill y Ward 1989) y el Fosetyl- Al correlacionando su acción curativa con acumulación de fitoalexina resveratol en la vid (Deckers y Creasy 1989).

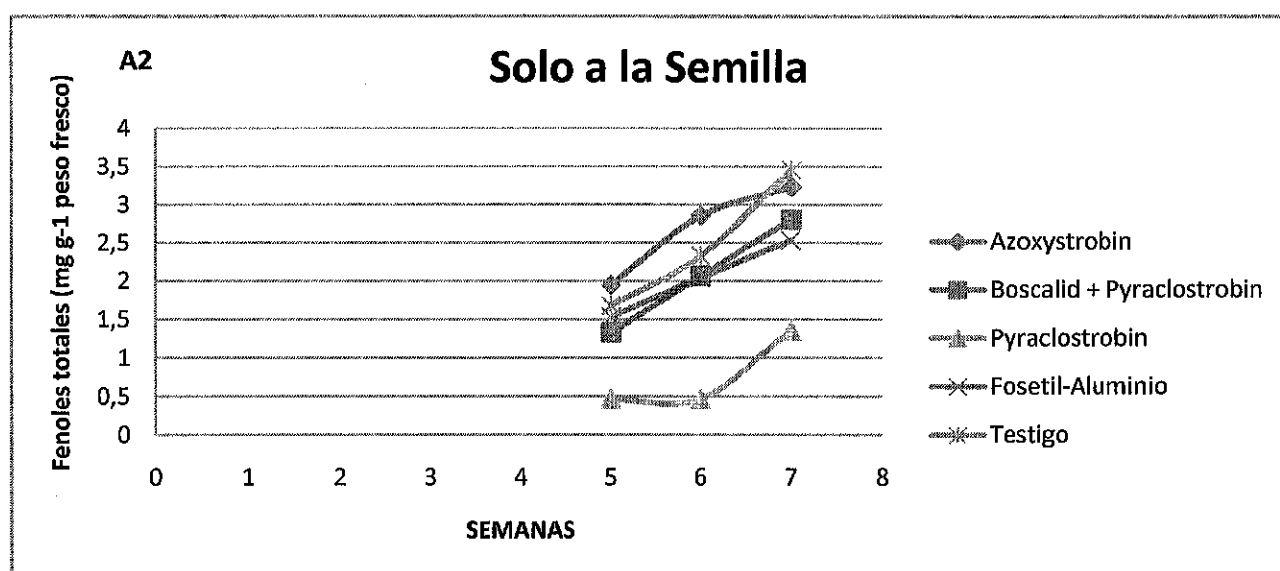
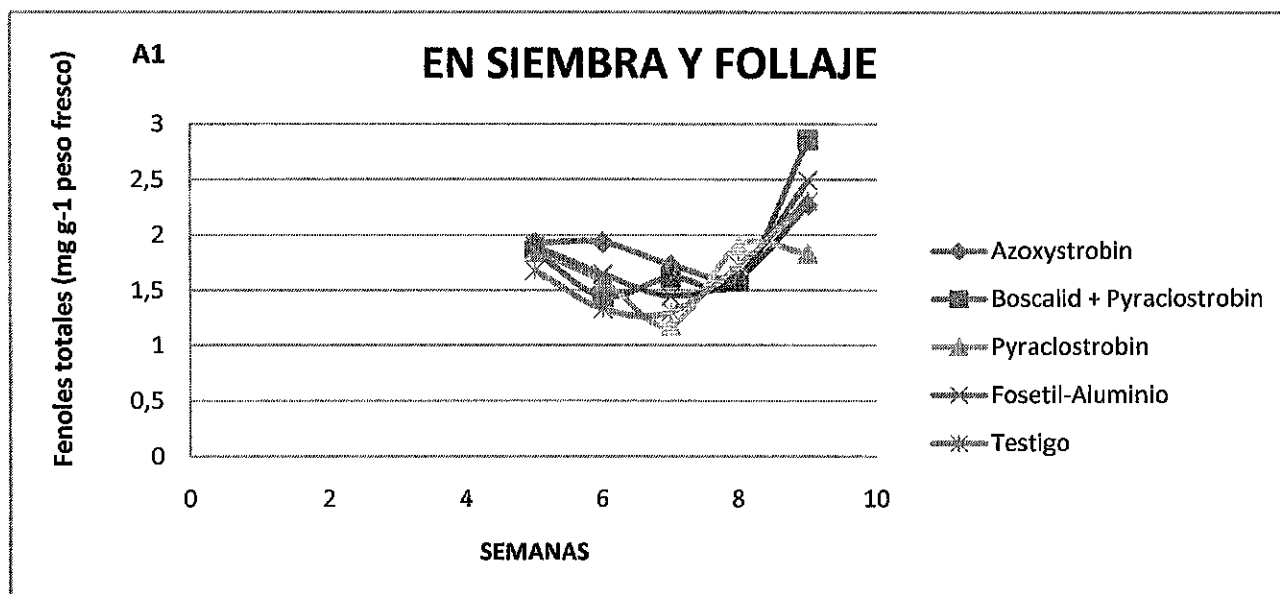


Fig. 6 A1 y A2 Promedio de fenoles alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.

### 5.5. Actividad de Peroxidasas (EC.1.11.1.7, POX)

La actividad, se debe a una cantidad mayor de sustrato como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual se produce durante la respiración que pudiera aumentar debido al estrés causado por la infección dando lugar a una mayor síntesis de etileno, ya que aumenta bruscamente durante el estrés causado por un patógeno, este entonces comenzara la producción de fitoalexinas (Boller 1992 y Robinson, 1991).

En este estudio, se registraron las siguientes actividades de la peroxidasa: para los tratamientos dirigidos a semilla y follaje, los valores máximos fueron los obtenidos en el tratamiento 3 Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®) con una actividad de 4319.538 U<sup>-1</sup> peso fresco, en la octava semana, mientras que la mínima actividad corresponde al tratamiento 1 Azoxystrobin (Amistar ®) con una actividad de 650.449 U<sup>-1</sup> peso fresco en la séptima semana (fig.7 A1).

Con respecto al análisis estadístico (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), cuando las aplicaciones fueron a follaje y a semilla los datos obtenidos no presentan diferencia significativa entre los tratamientos con los fungicidas Boscalid + Pyraclostrobin, Fosetil-Aluminio (Cabrio-C ®, Aliette ®) y el testigo, mientras que si presenta para Azoxystrobin (Amistar ®), con la actividad mínima la escasa producción de fitoalexinas (Boller, 1992), es por eso que su porcentaje de infección fue del 76%. El tratamiento que represento la mayor actividad de peroxidasa fue el de Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®), y aunque debió de haber representado menor porcentaje de infección, alcanzo el valor porcentual del 73%, esto pudo ocurrir porque la resistencia ocurre cuando una o mas fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno (Andreu, *et al.*, 2000), en este caso no fue suficiente la concentración para evitar que el patógeno siguiera desarrollándose (fig. 7 A2).

En el tratamiento dirigido únicamente a la semilla, el análisis estadístico (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) no mostro diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. Con respecto a la actividad de POX y los valores registrados, se obtuvieron valores mínimos para el fungicida Fosetil-Aluminio (Aliette ®) en la quinta semana de 783.669 U<sup>-1</sup> peso fresco, mientras que los valores máximos de la actividad se presentaron para Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C ®) en la semana siete con 4747.382 U<sup>-1</sup> peso fresco (cuadro 2, Apendice 5).

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

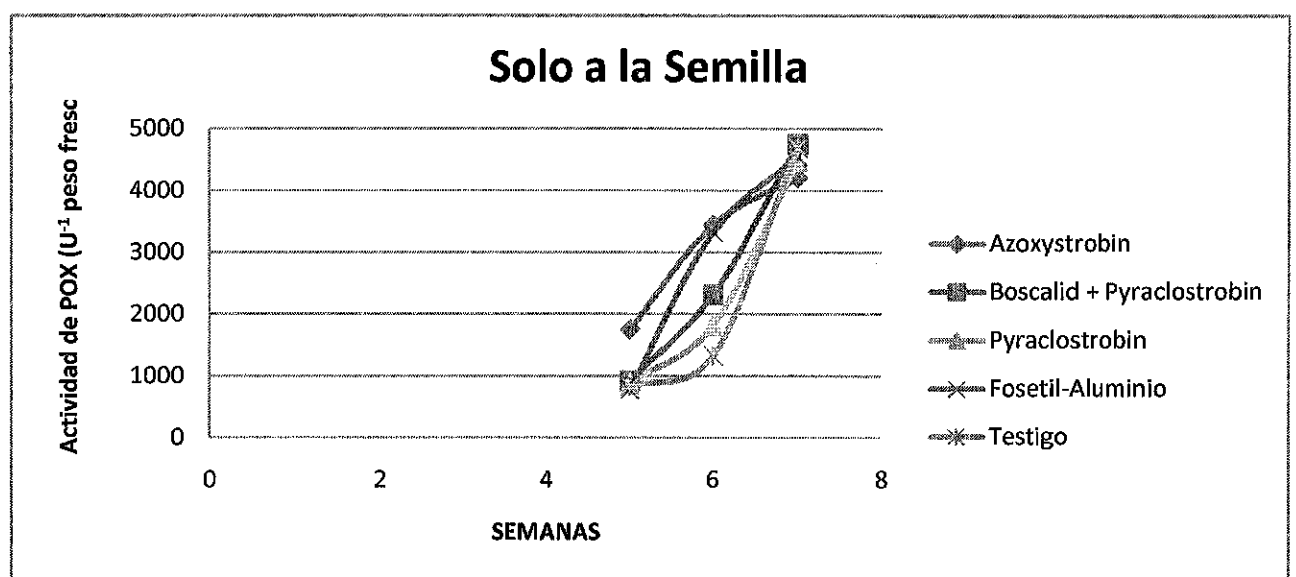
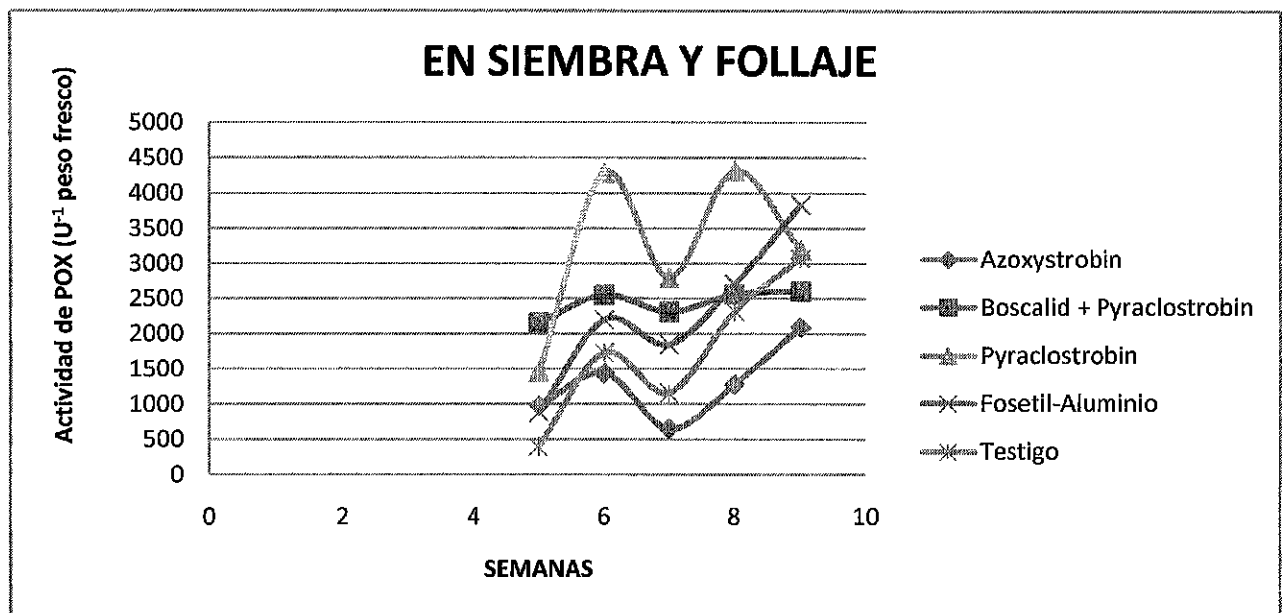


Fig. 7 A1 Y A2, Promedio de actividad de POX (peroxidasa) alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.



## 5.6. Actividad de Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)

En los tratamientos aplicados a semillas y a follaje, la mayor actividad se registra para el tratamiento con el fungicida Fosetil-Aluminio (Aliette ®), alcanzando valores de  $0.13279 \text{ Ug}^{-1}$  peso fresco en la semana 6, mientras que la mínima actividad se registro para el tratamiento con el fungicida Cabrio-C en la semana numero 5 con un valor de  $0.00766 \text{ Ug}^{-1}$  peso fresco. No hubo diferencia significativa para los tratamientos aplicados a semilla y a follaje de los fungicidas Azoxystrobin (Amistar ®), Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C ®), Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®) y el testigo, lo que indica que cuando hubo eliminación del patógeno por efecto de los fungicidas, la actividad PAL, se mantuvo, ya que la planta no detectó la presencia del patógeno para inducir la actividad de PAL y por lo tanto síntesis de fitoalexinas. Por su parte, el tratamiento con fungicida Aliette registro un aumento muy significativo con respecto a los demás tratamientos, y comparado con su porcentaje de infección de la semana 6 que es cuando comienza a aumentar la actividad, se puede decir entonces que en los tejidos enfermos hay mayor actividad de la PAL (Fig. 8 A1 y A2), que es una enzima clave para la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Goodman, *et al.*, 1986).

Por otra parte, se sabe que algunos plaguicidas también pueden inducir la producción de fitoalexinas. Cahill y Ward (1989) reportan que el "Metalaxyl" usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* en soya liberada de su micelio los elicitores de la gliceolina aumentando la síntesis de esta fitoalexina.

Para tratamiento únicamente en semilla, se registraron valores mínimos para el testigo en la semana número 5, con una actividad de  $0.02375 \text{ Ug}^{-1}$  peso fresco, mientras que el valor máximo fue para Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C®) con un valor de  $0.05670 \text{ Ug}^{-1}$  peso fresco, sin diferencia significativa (Tukey  $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 2, Apendice 5).

Dercks y Creasy en 1989, correlacionaron la acción curativa de Fosetyl-Al con el nivel de acumulación de fitoalexina resveratrol en la vid. Por otro lado Trujillo *et al.*, (2001) determinaron el efecto del activador de resistencia Bion 50 WG como estrategia de control

químico del tizón tardío para cultivares resistentes, y el control de manchas foliares fungosas y rizoctoniasis obteniendo resultados positivos.

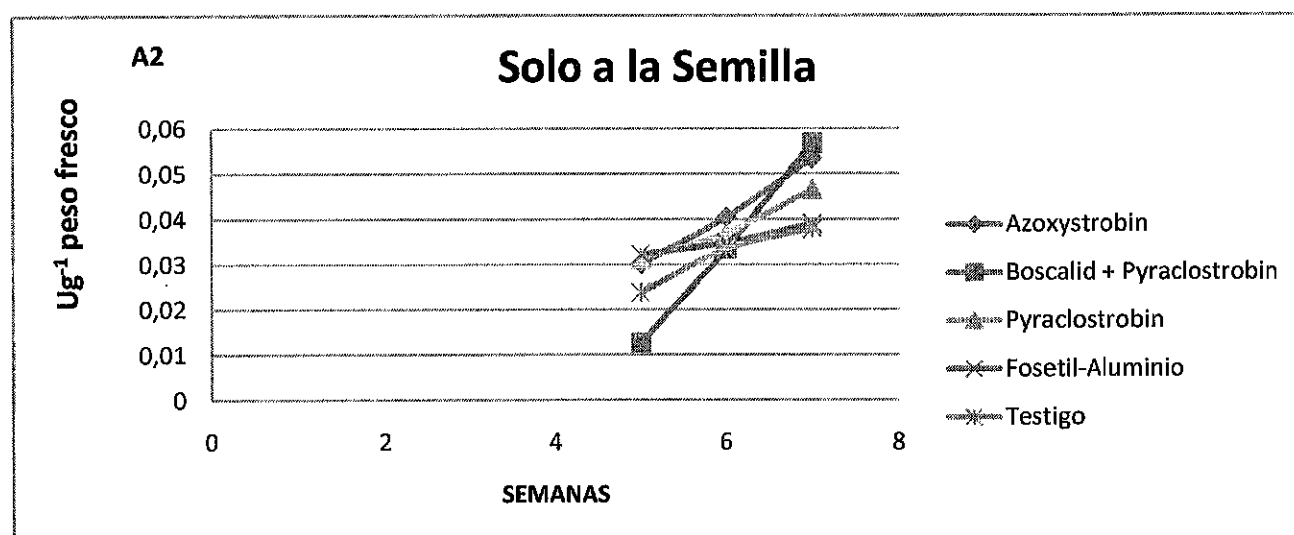
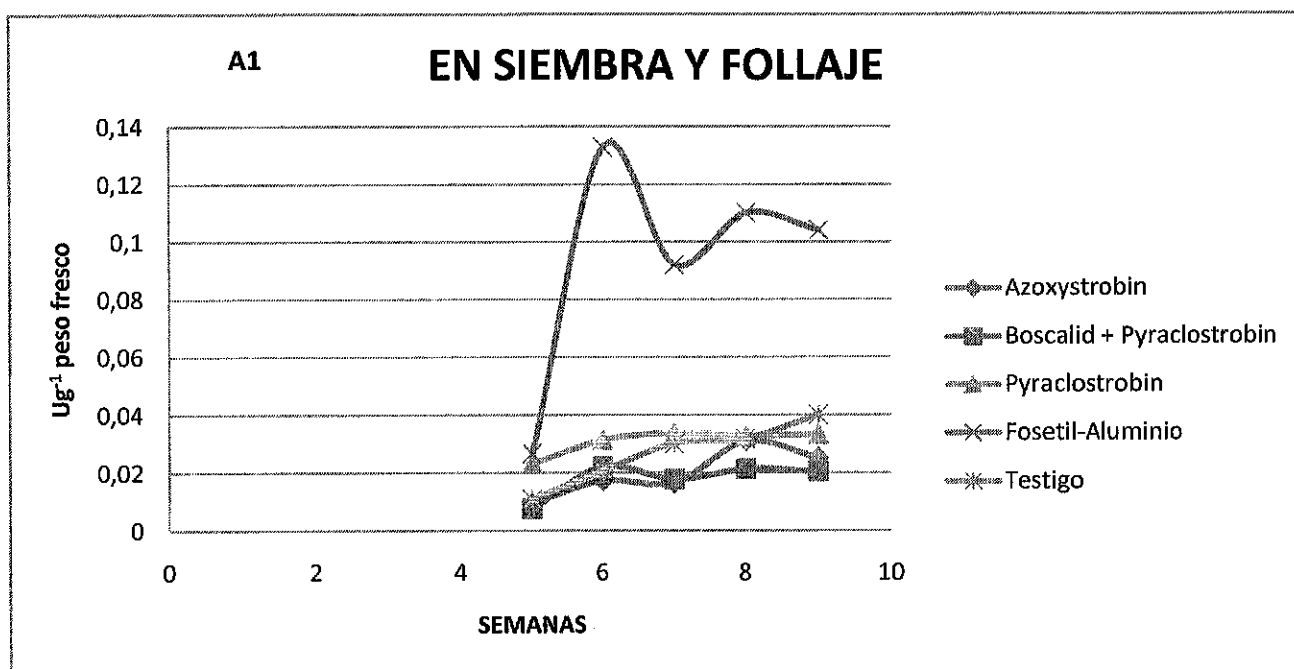


Fig. 8 A1 y A2, Promedio de actividad de PAL representados por  $Ug^{-1}$  p.f alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla solo a la semilla.

### 5.7. Actividad de Superóxido dismutasa (1.15.1.1. SOD)

En el tratamiento dirigido a follaje y semilla los valores mínimos fueron por el tratamiento por Azoxystrobin (Amistar®), alcanzando una actividad de  $22.896 Ug^{-1}p.f$  en la semana 9, mientras los valores máximos los representa el tratamiento por Fosetil- Aluminio (Aliette ®), teniendo una actividad final de  $162.687 Ug^{-1}p.f$ . En cuanto al análisis

estadístico se refiere (Tukey  $P \leq 0.05$ ), si existen diferencias significativas para los tratamientos por Aliette y Amistar, Cabrio-C, mientras que para CABRIO 20 EG ® y el testigo, no presentaron diferencias significativas (fig. 9 A1 y A2). Bowler *et al.*, en 1994, reportaron que el estrés ambiental tiene un impactante efecto sobre la expresión y actividad SOD en plantas, al igual que las condiciones adversas como sequia, bajas temperaturas, anoxia y ataque por patógenos, condiciones que en ese momento existían en el campo en donde se estableció el experimento.

Respecto a la relación que SOD/porcentaje de infección, la actividad alta que presento el fungicida Fosetil-Aluminio (70% en la semana 9), si corresponde con el efecto de resistencia inducida, pero las actividades mínimas registradas por Boscalid + pyraclostrobin (Cabrio-C ®) y Azoxystrobin (Amistar ®) no corresponden a la defensa de la planta, ya que las plantas a las que se les aplico el tratamiento con Boscalid + pyraclostrobin (Cabrio-C ®) tuvieron una infección del 58% (el menor presentado, para la semana 5), mientras que las plantas cuyo tratamiento corresponde a Azoxystrobin (Amistar ®), tuvieron el segundo mas alto porcentaje de infección con 76% después del testigo.

Para el tratamiento dirigido solo a la semilla, se presentaron las siguientes actividades: la menor actividad fue para Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®), alcanzando en la séptima semana una actividad de  $63.471 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f}$ , mientras que la mayor, fue para el tratamiento con el fungicida Cabrio-C con una actividad de  $102.457 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f}$  en la semana 7 (fig.9 A1). Cabe señalar que los muestreos solo se limitaron a la semana número 7, ya que las plantas en la semana 8 y 9 se encontraban severamente dañadas o ya no poseían follaje.

Estadísticamente no existen diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos ni con el testigo (Cuadro 2, Apendice 5), sin embargo si se alcanzaron valores altos en la actividad de la superóxido dismutasa en la primera semana aunque la actividad decae, lo que habla de una posible defensa de la planta contra el patógeno cuando las condiciones ambientales eran en mayor medida propicias para el desarrollo de este, la actividad decae hacia la semana 6 porque el porcentaje de infección es muy alto y muy severo. En cuanto a los porcentajes de infección presentados por este tratamiento, en comparativa con el nivel de la actividad de la superóxido dismutasa si corresponden en cuanto a sus altos índices se refiere.

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

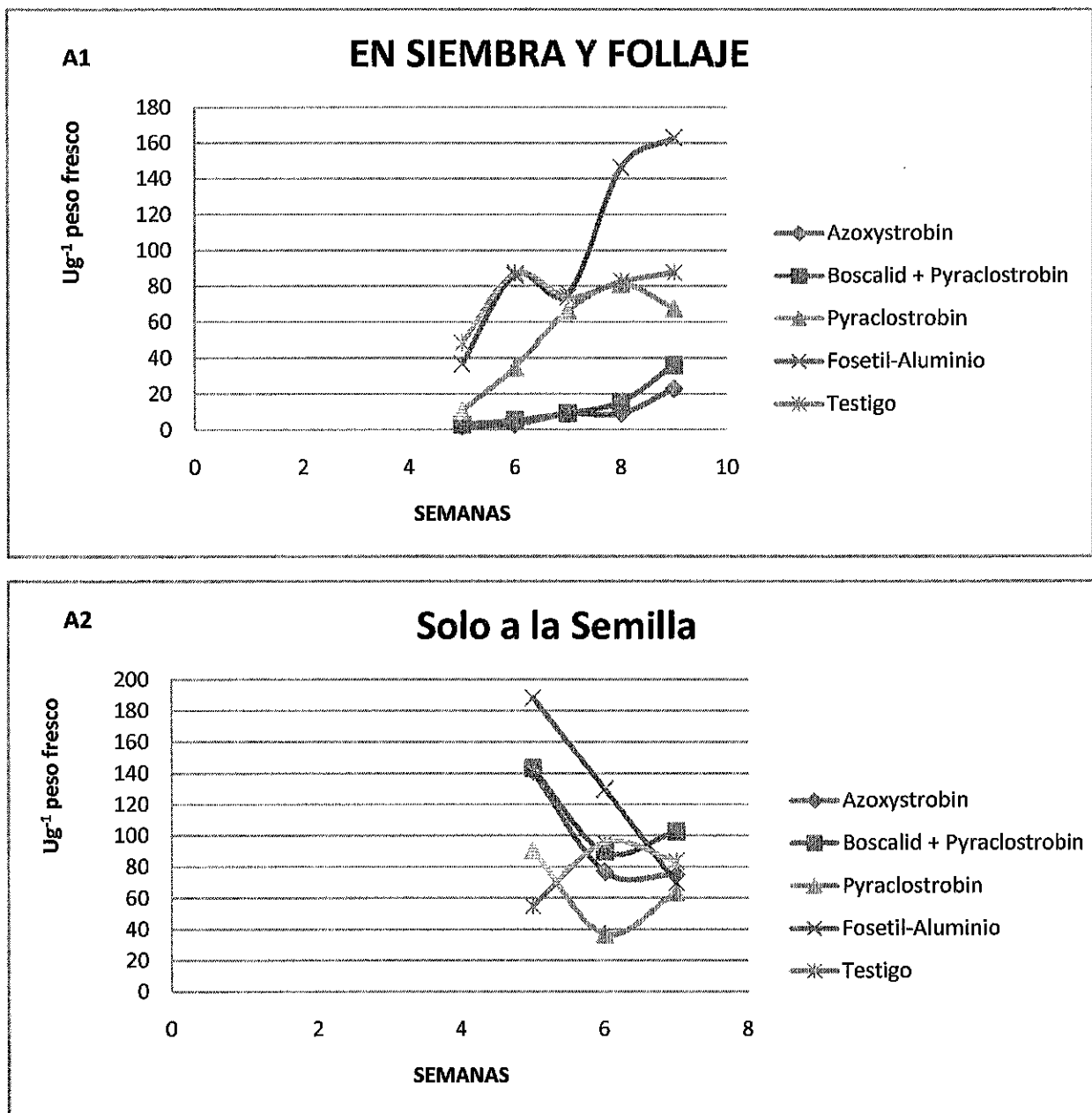


Fig 9 A1 y A2 Promedio de actividad de SOD representados por  $Ug^{-1}$  p.f (superóxido dismutasa) alcanzado de la semana 5 a la 9 por tratamiento de fungicidas aplicados a follaje y a la semilla y solo a la semilla.

## 5.8. Análisis de Correlación

Las correlaciones entre variables para cada material se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de  $\alpha=0.05$ . La correlación que resulto significativa en el tratamiento dirigido a semilla y a follaje con el fungicida Azoxystrobin fue para SOD/INF ( $r=0.93894^*$ ) y PAL/INF ( $r=0.82925^*$ ), las demás resultaron no ser significativas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Amistar.**

|                                  |     | FEN     | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
|----------------------------------|-----|---------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                  | FEN | 1.00000 | 0.40752 <sup>ns</sup><br>0.4959 | 0.30567 <sup>ns</sup><br>0.6170  | 0.48709 <sup>ns</sup><br>0.4053  | 0.03179 <sup>ns</sup><br>0.9595  |
| <b>Semilla<br/>Y<br/>Follaje</b> | POX |         | 1.00000                         | 0.69474 <sup>ns</sup><br>0.1929  | 0.50732 <sup>ns</sup><br>0.3829  | 0.63821 <sup>ns</sup><br>0.2466  |
|                                  | SOD |         |                                 | 1.000000                         | 0.60233 <sup>ns</sup><br>0.2824  | 0.93894<br>0.0179                |
|                                  | PAL |         |                                 |                                  | 1.000000                         | 0.82925 <sup>ns</sup><br>0.0825  |
|                                  | INF |         |                                 |                                  |                                  | 1.000000                         |
|                                  |     |         |                                 |                                  |                                  |                                  |
|                                  | FEN | 1.00000 | 0.99984<br>0.0113               | -0.96424 <sup>ns</sup><br>0.1708 | 0.95631<br>0.1889                | 0.98898<br>0.0946                |
| <b>Solo<br/>Semilla</b>          | POX |         | 1.00000                         | -0.95938 <sup>ns</sup><br>0.1821 | 0.96136<br>0.1776                | 0.99146<br>0.0833                |
|                                  | SOD |         |                                 | 1.00000                          | -0.84464 <sup>ns</sup><br>0.3596 | -0.91440 <sup>ns</sup><br>0.2653 |
|                                  | PAL |         |                                 |                                  | 1.00000                          | 0.98905<br>0.0943                |
|                                  | INF |         |                                 |                                  |                                  | 1.00000                          |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, POX: Peroxidasa, SOD: Superoxido dismutasa, PAL: Fenilalanina-amonió-liasa. ns: No significativo.

En el tratamiento sin fungicida, hubo significancia en la correlación POX/FEN ( $r=0.999984^*$ ), FEN/PAL ( $r=0.95631^*$ ), PAL/POX ( $r=0.96136^*$ ), FEN/INF ( $r=0.98898^*$ ), INF/POX ( $r=0.99146$ ) y PAL/INF ( $r=0.98905$ ). Todas estas correlaciones, están ligadas a la síntesis de fitoalexinas, de acuerdo con Goodman, *et al.*, (1986), y como ya se mencionó, la PAL es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina. Las correlaciones de FEN/SOD, POX/SOD, SOD/PAL y SOD/INF,

no resultan ser significativas dado sus valores negativos. La respuesta de defensa de fitoalexinas implica la activación rápida de genes de transcripción que codifican un número de enzimas de fitoalexinas incluyendo la PAL (Manibhushanrao *et al.*, 1988).

Para Boscalid + Pyraclostrobin (Cabrio-C®), la aplicación a semilla y follaje produjo valores significativos para FEN/SOD ( $r=0.93021^*$ ), POX/PAL ( $r=0.91940^*$ ) y SOD/INF ( $r=0.95389^*$ ) (cuadro 2). En el tratamiento solo dirigido a la semilla, parecen aumentar las correlaciones entre las distintas enzimas en este estudio como es el caso de: FEN/POX ( $r=0.98812^*$ ), FEN/PAL ( $r=0.99962^*$ ), POX/PAL ( $r=0.99198^*$ ), FEN/INF ( $r=0.99999^*$ ), POX/INF ( $r=0.98880^*$ ) y PAL/INF ( $r=0.99973^*$ ), con valores casi cercanos a  $r=1.000$ , lo que demuestra la activación de casi todas las enzimas para la defensa de la planta.

**Cuadro 2. Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Cabrio-C.**

|                                  |     | FEN     | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
|----------------------------------|-----|---------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                  | FEN | 1.00000 | 0.31462 <sup>ns</sup><br>0.6061 | 0.93021<br>0.0219                | 0.08062 <sup>ns</sup><br>0.8975  | 0.81674 <sup>ns</sup><br>0.0915  |
| <b>Semilla<br/>Y<br/>Follaje</b> | POX |         | 1.00000                         | 0.63032 <sup>ns</sup><br>0.2543  | 0.91940<br>0.0271                | 0.70193 <sup>ns</sup><br>0.1864  |
|                                  | SOD |         |                                 | 1.00000                          | 0.43774 <sup>ns</sup><br>0.4610  | 0.95389<br>0.0118                |
|                                  | PAL |         |                                 |                                  | 1.00000                          | 0.58384 <sup>ns</sup><br>0.3013  |
|                                  | INF |         |                                 |                                  |                                  | 1.00000                          |
|                                  |     |         |                                 |                                  |                                  |                                  |
|                                  |     | FEN     | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
|                                  | FEN | 1.0000  | 0.98812<br>0.0982               | -0.72629 <sup>ns</sup><br>0.4825 | 0.99962<br>0.0175                | 0.99999<br>0.0028                |
| <b>Solo<br/>Semilla</b>          | POX |         | 1.0000                          | -0.61204 <sup>ns</sup><br>0.5807 | 0.99198<br>0.0807                | 0.98880<br>0.0954                |
|                                  | SOD |         |                                 | 1.0000                           | -0.70708 <sup>ns</sup><br>0.5000 | -0.72324 <sup>ns</sup><br>0.4853 |
|                                  | PAL |         |                                 |                                  | 1.00000                          | 0.99973<br>0.0147                |
|                                  | INF |         |                                 |                                  |                                  | 1.00000                          |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, POX: Peroxidasa, SOD: Superoxido dismutasa, PAL: Fenilalanina-amonió-liasa. ns: No significativo.

Con el fungicida Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®), se obtuvieron las siguientes correlaciones; significativas únicamente para tratamiento solo a semilla, FEN/POX ( $r=0.96835^*$ ), FEN/PAL ( $r=0.99819^*$ ), POX/PAL ( $r=0.98161^*$ ), FEN/INF ( $r=0.90634^*$ ),

POX/INF ( $r=0.98312^*$ ), PAL/INF ( $r=0.93010^*$ ) (cuadro 3), aunque se presentan valores negativos en este estudio, si se puede apreciar el mecanismo de defensa contra *Phytophthora infestans*, por lo que se observa en campo una mayor reacción de hipersensibilidad y un establecimiento relativamente rápido de la RSA.

**Cuadro 3. Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Pyraclostrobin (CABRIO 20 EG ®).**

|                                  |     | FEN     | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
|----------------------------------|-----|---------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                  | FEN | 1.00000 | 0.02272 <sup>ns</sup><br>0.9711 | 0.13839 <sup>ns</sup><br>0.8244  | 0.01392 <sup>ns</sup><br>0.9823  | 0.58072 <sup>ns</sup><br>0.3046  |
| <b>Semilla<br/>Y<br/>Follaje</b> | POX |         | 1.00000                         | 0.58731 <sup>ns</sup><br>0.2978  | 0.71314 <sup>ns</sup><br>0.1763  | 0.42339 <sup>ns</sup><br>0.4775  |
|                                  | SOD |         |                                 | 1.00000                          | 0.88375 <sup>ns</sup><br>0.0467  | 0.86040 <sup>ns</sup><br>0.0613  |
|                                  | PAL |         |                                 |                                  | 1.00000                          | 0.76985 <sup>ns</sup><br>0.1279  |
|                                  | INF |         |                                 |                                  |                                  | 1.00000                          |
|                                  |     |         |                                 |                                  |                                  |                                  |
|                                  |     | FEN     | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
|                                  | FEN | 1.0000  | 0.96835<br>0.1606               | -0.00440 <sup>ns</sup><br>0.9972 | 0.99819<br>0.0383                | 0.90634<br>0.2777                |
| <b>Solo<br/>Semilla</b>          | POX |         | 1.0000                          | -0.25383 <sup>ns</sup><br>0.8366 | 0.98161<br>0.1223                | 0.98312<br>0.1172                |
|                                  | SOD |         |                                 | 1.00000                          | -0.06450 <sup>ns</sup><br>0.9589 | -0.42654 <sup>ns</sup><br>0.7195 |
|                                  | PAL |         |                                 |                                  | 1.0000                           | 0.93010<br>0.2394                |
|                                  | INF |         |                                 |                                  |                                  | 1.00000                          |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, POX: Peroxidasa, SOD: Superoxido dismutasa, PAL: Fenilalanina-amonió-liasa. ns: No significativo.

Para el fungicida Fosetil- Aluminio (Aliette ®), la correlación entre INF/POX, resultó ser para ambos tipos de aplicación casi coincidente ( $r=0.93220^*$ ). Para el tratamiento dirigido semilla y follaje, y  $r=0.96973^*$  para el tratamiento solo semilla, por lo que se puede observar la relación directa entre esta enzima y el fungicida funcionando como elicitador químico directo.

Los valores significativos presentados en este estudio fueron; para tratamiento a semilla y follaje de POX/SOD ( $r=0.95665^*$ ) y SOD/INF ( $r=0.93546^*$ ). Para tratamiento solo a semilla FEN/POX ( $r=0.98208^*$ ), FEN/INF ( $r=0.99837^*$ ), los demás valores en ambos estudios y las correlaciones entre las enzimas resultaron no significativos (cuadro 4).

**Cuadro 4. Correlación entre variables para el tratamiento dirigido a semilla y a follaje, y solo semilla del fungicida Aliette.**

|                                  |     | FEN    | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
|----------------------------------|-----|--------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Semilla<br/>Y<br/>Follaje</b> | FEN | 1.0000 | 0.58280 <sup>ns</sup><br>0.3024 | 0.47365 <sup>ns</sup><br>0.4203  | -0.11701 <sup>ns</sup><br>0.8514 | 0.47665 <sup>ns</sup><br>0.4169  |
|                                  | POX |        | 1.0000                          | 0.95665<br>0.0108                | 0.65707 <sup>ns</sup><br>0.2283  | 0.93220<br>0.0210                |
|                                  | SOD |        |                                 | 1.0000                           | 0.61864 <sup>ns</sup><br>0.2659  | 0.93546<br>0.0195                |
|                                  | PAL |        |                                 |                                  | 1.0000                           | 0.51592 <sup>ns</sup><br>0.3735  |
|                                  | INF |        |                                 |                                  |                                  | 1.0000                           |
|                                  |     |        |                                 |                                  |                                  |                                  |
|                                  |     | FEN    | POX                             | SOD                              | PAL                              | INF                              |
| <b>Solo<br/>Semilla</b>          | FEN | 1.0000 | 0.98208<br>0.1207               | -0.99982 <sup>ns</sup><br>0.0121 | -0.83892 <sup>ns</sup><br>0.3664 | 0.99837<br>0.0363                |
|                                  | POX |        | 1.0000                          | -0.97833 <sup>ns</sup><br>0.1328 | -0.92646 <sup>ns</sup><br>0.2457 | 0.96973<br>0.1570                |
|                                  | SOD |        |                                 | 1.0000                           | 0.82844 <sup>ns</sup><br>0.3785  | -0.99927 <sup>ns</sup><br>0.0242 |
|                                  | PAL |        |                                 |                                  | 1.00000                          | -0.80651 <sup>ns</sup><br>0.4027 |
|                                  | INF |        |                                 |                                  |                                  | 1.0000                           |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, POX: Peroxidasa, SOD: Superoxido dismutasa, PAL: Fenilalanina-amoniio-liasa. ns: No significativo.

Las correlaciones en los testigos hubo pocas coincidencias (cuadro 5). Las correlaciones significativas para los testigos fueron: PAL/INF ( $r=0.96360^*$ ) para T1, mientras que para T2 que se encontraba desprotegido de FEN/POX ( $r= 0.96786^*$ ), SOD/PAL ( $r=0.96858^*$ ), FEN/INF ( $r=0.96607^*$ ) , POX/INF ( $r= 0.87006^*$ ) y PAL/INF ( $0.89778^*$ ).



**Cuadro 5. Correlación entre variables para los tratamientos testigo.**

|           |     | FEN     | POX                             | SOD                             | PAL                             | INF                             |
|-----------|-----|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|           | FEN | 1.00000 | 0.64902 <sup>ns</sup><br>0.2360 | 0.17316 <sup>ns</sup><br>0.7806 | 0.53669 <sup>ns</sup><br>0.3511 | 0.45313 <sup>ns</sup><br>0.4435 |
| <b>T1</b> | POX |         | 1.00000                         | 0.85447 <sup>ns</sup><br>0.0652 | 0.86715 <sup>ns</sup><br>0.0570 | 0.86895 <sup>ns</sup><br>0.0558 |
|           | SOD |         |                                 | 1.0000                          | 0.74866 <sup>ns</sup><br>0.1454 | 0.77650 <sup>ns</sup><br>0.1225 |
|           | PAL |         |                                 |                                 | 1.0000                          | 0.96360<br>0.0083               |
|           | INF |         |                                 |                                 |                                 | 1.0000                          |
|           |     |         |                                 |                                 |                                 |                                 |
|           |     | FEN     | POX                             | SOD                             | PAL                             | INF                             |
|           | FEN | 1.0000  | 0.96786<br>0.1618               | 0.56638 <sup>ns</sup><br>0.6167 | 0.75356 <sup>ns</sup><br>0.4567 | 0.96607<br>0.1663               |
| <b>T2</b> | POX |         | 1.00000                         | 0.34091 <sup>ns</sup><br>0.7785 | 0.56401 <sup>ns</sup><br>0.6185 | 0.87006<br>0.3282               |
|           | SOD |         |                                 | 1.0000                          | 0.96858<br>0.1600               | 0.76003 <sup>ns</sup><br>0.4504 |
|           | PAL |         |                                 |                                 | 1.00000                         | 0.89778<br>0.2904               |
|           | INF |         |                                 |                                 |                                 | 1.00000                         |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, POX: Peroxidasa, SOD: Superoxido dismutasa, PAL: Fenilalanina-amonio-liasa. ns: No significativo. T1: Testigo ubicado en la parcela de los tratamientos dirigidos a semilla y follaje. T2: Testigo ubicado en la parcela de los tratamientos dirigidos solo a semilla.

## 6. Discusión general

Considerando que los nuevos fungicidas se enfocan también sobre su efecto en el hospedante, es importante saber hasta que punto los productos estimulan las reacciones de defensa de la planta. Aquí se incluyeron tratamientos muy limitados como únicos al tubérculo- semilla al momento de la siembra, o a la semilla y una sola vez al follaje de papa un mes después, con fungicidas que no son específicos contra oomicetos, para estudiar hasta que punto los efectos residuales de los tratamientos estimulaban las reacciones de defensa de la planta para protección indirecta contra la infección natural del tizón tardío. No hubo protección posterior al follaje cuando la aplicación fue solo a la siembra, pues la infección foliar en los tratamientos fue similar a la del testigo sin fungicidas, pero con una aspersión al follaje, la infección final fue de 60-80% con respecto al testigo (100%). En general, hubo similitud entre los patrones de síntesis y/o actividad de los metabolitos de defensa estimulados por los productos, sin diferencias estadísticas significativas. Así a medida que avanzó la infección se detectaron incrementos en fenoles (FEN), en peroxidasa (POX) y en fenilalanina- amonioliasa (PAL), con irregularidades en la acción de POX y la superóxido dismutasa (SOD) al aplicarse los productos de la semilla y al follaje, y con descenso de la actividad de la SOD cuando los productos se aplicaron solo a la semilla. No obstante, destaca el estímulo inducido por Fosetil-Aluminio (Aliette®) en la actividad de SOD y PAL cuando se aplicó a la semilla y al follaje, superando significativamente el resto de los tratamientos (Cuadros 3, 4 y 5, Apéndice 6). Este producto si es contra oomicetos, aunque su aplicación se hizo en un tiempo cuando el patógeno aun no estaba presente. Las similitudes de respuesta bioquímica en la mayoría de las combinaciones metabolito- agroquímico se respaldan con altas correlaciones obtenidas entre las variables, lo que refleja la estrecha interacción o actividad conjunta entre los metabolitos cuantificados. Por el contrario, el estímulo atípico de Fosetil-Aluminio (Aliette®) sobre SOD y PAL cuando se aplicó a la semilla y al follaje, se limitó a la correlación de la SOD con la infección y con POX, mientras que la PAL actuó de manera independiente, sin correlación significativas con las otras variables. Se concluye que los productos incluidos en el presente estudio estimulan respuestas comunes de defensa no-específica de la planta, pero no lo suficiente como para protección contra patógenos para los que dichos productos no actúan, y que las estrechas correlaciones entre los metabolitos manifiestan el carácter poligénico de las respuestas de defensa de la planta.

## **7. CONCLUSIONES**

Los productos incluidos en este estudio, estimularon respuestas comunes de defensa no específica de la planta aunque no lo suficiente para completar su ciclo ni para protección contra patógenos para los que dichos productos no actúan.

Las estrechas correlaciones encontradas entre presencia y actividad de los metabolitos cuantificados, son la manifestación del carácter poligénico de las respuestas de la defensa de la planta.

## 8. LITERATURA CITADA

Abad , Z. G., Abad J.A, and Ochoa, C. 1995. Historical Evidence on Occurrence of the Late Blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. P:36-41., En: *Phytophthora infestans* 150. Dowley, L.J., Bannion E.,Cooke., R. L., Keane T. and O' Sullivan E., eds., Boole Press Ltd. Dublin.

Abeles F.B y Biles C.L. 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 95: 269-273.

Agrawal, A.A. 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science* 279: 1201-1202

Agrios G., N. 2001. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial UTEHA. México. 973 p.

Alia-Tejacal I., Colinas- León M. T. C, Martínez- Damián M.T., y Soto- Hernández M. R.. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota Jacq*) durante poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8: 263-271.

Andreu A., Oliva C., Distel S., and Daleo G. 2000. Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 44: 1-9.

Ardila Harold, Higuera B. L. 2005. Polifenoloxidasa y beta 1-3 glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Arz C. M. and Grambow J. H. 1995. Elicitor and Suppressor Effects on Phospholipase C in Isolated Plasma Membranes Correlate with Alterations in Phenylalanine Ammonia-lyase

Aurora K. and Wangle D. S. 1985. Interrelationship between peroxidase, 'polyphenol oxidase activities and phenolic content of wheat for resistance to loose smut. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 180: 75-80.

Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C y Rolando C. 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.

Banci L. 1997. Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.

Bakardjieva NT, Christova N y Christov K. 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitive of peroxidase from mosses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Can J Bot* 74: 1665-1670.

Bao W, O'Maley DM, Whetten R y Sederoff RR. 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.

Bellani LM, Guarnieri M y Scialabba A. 2002. Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol Plant* 114: 102-108.

Bernards M.A, Fleming W.D, Llewellyn D.B, Priefer R, Yang X, Sabatino A y Plourde GL. 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121: 135-145.

Beyer F., Fridovich W. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analyt. Biochem.* 161:559-566.

Brady JD , Sadler IH y Fry SC. 1996. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *J Biochem* 315: 323-327.

Blee KA, Wheatley ER, Bonham VA, Mitchell GP, Robertson D, Slabas AR, Burrell MM, Wojtaszek P y Bolwell GP. 2001. Proteomics analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* 212: 404-415.

Boller t., Geheri A., Mauch F. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta*, 157: 22-31.

Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Januneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré- Tugayé MT, Boudet A y Pont-Lezica R. 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421- 3432.

Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R y Turner SR. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17: 2281-2295.

Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF y Dey PM. 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol* 109: 1115-1123.

Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT y Pont-Lezica R. 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.

Boudet A.M, Lapierre C y Grima-Pettenati J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the lignification. *New Phytol* 129: 203-236.

Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M, Inze D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Rev. Plant. Sci* 13: 199-218.

Bostock R. M., Kue J. A and Laine. R. A. 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpens in the potato. *Science* 212: 67-69.

Cahill D. M. and Ward E. W. B., 1989. Effects of metalaxyl on elicitor activity, simulation and glyceollin production and growth of sensitive and tolerant isolates of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 35:97-112.

Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R y Ros Barceló A. 1993. Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. Hort Sci 28: 38-40.

Camarena, G. G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, Vol. 12, número 001. Pp. 25-30.

Campbell M. M. and Ellis B. 1992. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures II. Cell wall-bound phenolics. Phytochemistry 31:737-742.

Carpita NC y Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J 3: 1-30.

Carpita NC. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 445-476

Cassab GI y Varner JE. 1988. Cell wall proteins. Annu Rev Plant Physiol 39: 321-353.

Chibbar RN, Cella R y van Huystee RB. 1984. The heme moiety in peroxidase. Can J Biochem Cell Biol 62: 1046-1050.

Collen J, Ekdhal A, Abrahamsson K y Pedersen M. 1994. The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. Phytochemistry 36:1197-1202.

Cornide, M. T., Lima H., y Surlí J.. 1994. La Resistencia Genética de las Plantas Cultivadas. Editorial Científico- Técnica. La Habana, Cuba. 194 p.

Converso DA y Fernández ME. 1996. Ca<sup>2+</sup> activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. Arch Biochem Biophys 333: 59-65.

Cosgrove DJ. 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and peanut forwards. *Plant Physiol* 125: 131-134.

Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R y Canut H. 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66: 453-461.

Chester, K. 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quart. Rev. Biol.* 8: 129-151

Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV y Boerjan W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.

Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu X-L, Knox JP, Bolwell P y Slabas AR. 2002. Proteomics analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* 23: 1754-1765.

Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H y Penel C. 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem* 99: 177-186.

Cvikrová, M., Hrubcová M, Vágner M., Ivana M., and Eder J. 2003. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. *Plant Pathol.* 52:22-29.

Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DA y Denecke J. 1999. Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde Bulk Flow. *Plant Cell* 11: 2233-2247 .

Czaninski Y y Catesson AM. 1969. Localisation ultrastructurale d'activites peroxydasiques dans les tissus conducteurs vegetaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie* 8: 875-888.



Dai G. H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). Eur. J. Plant Pathol. 101:541-547 (1995).

Darvill A. G. and Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35:243-275.

Davin LB y Lewis NG. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. Plant Physiol 123: 453-461.

Dean JFD y Eriksson KEL. 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. Holzforschung 48: 21-33.

Dercks W. and Creasy L., 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. Physiol. And Mol. Plant Pathol. 34:203-213.

Dixon R. A. and C. J. Lamb. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 41:339-367.

Donaldson LA. 1985. Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. NZJ For Sci 15: 349-360.

Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Rojo-Domínguez A, Whitaker JR, Arroyave-Hernández C y Regalado C. 2003. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isoenzyme. Phytochemistry 62: 5-11.

Duroux L y Welinder KG. 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. J Mol Evol 57: 397-407.

Favali M. A., Conti G.G. and Bassi M. 1978. Modifications of the vascular bundle ultrastructure in the "resistant zone" around necrotic lesions induced by tobacco mosaic virus Physiol. Mol. Plant. Pathol. 13:247-251.

Ferrer MA y Ros Barceló A. 1994. Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of coniferyl alcohol. J Plant Physiol 144: 64-67.

Flurkey W. H. and Jen J. J. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. J. of Food Sci. 43:1828-1831.

Fry, E.W., Goodwin S. D., Dyer A.T., Matuszak J. K, Drent H., Tooley P.W., Sujkwoski, L.S., Koh, Y. K., Cohen B. A., Spielman L. J. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and Implications. Plant Disease 77(7): 653-661.

Fukuda H. 1996. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 299-325.

Garcia, R. J., Correa, R. T., Gastelum, R.F., Orum T. V., Washman C.C. and Nelson, M. R., 2000. Temporal and Spatial Patterns of Genetic Structure of *Phytophthora infestans* from Tomato and Potato in the del Fuerte Valley. Phytopathology. 90(11):1188-1195.

Goodman N. R., Kiraly Z. and K. R. Wood. 1986. The biochemistry and Physiology of Plant Disease. University of Missouri Press. Columbia. U.S.A. 433p.

Grabber JH, Ralph J y Hatfield RD. 1998. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. J Sci Food Agric 78: 81-87.

Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP y Montgomery R. 1996. The glycans of soybean peroxidase. Glycobiology 6: 23-32.

Grambow HJ y Langenbeck-Schwich B. 1983. The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxidase, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. Planta 157: 131-137.

Green BN y Oliver RWA. 1991. The study of intact proteins and glycoproteins by electrospray m.s. *Biochem Soc Trans* 19: 929-935.

Griffith, G.W and Shaw, D. S.,1998. Polimorphysm in *Phytophthora infestans*:Four mitochondrial Haplotips are detected after PCR Amplification DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied of Enviromental Microbiology* 64(10):4007-4014.

Grisebach H. 1981. Lignins. En "The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise" (Conn EE, ed) Academic Press

Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M y Catesson AM. 1987. Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. *J Exp Bot* 38: 1378-1390.

Gustine D. L., Sherwood R. T., Moyer B. G., and Lukezic. F. L., 1991. Metabolites from *Pseudomonas corrugate* elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. *Phytopathology* 80: 1427-1432.

Hahn M. G., A. G. Darwill and P. Albersheim. 1981. Host pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68:1161-1169.

Hahlbrock K y Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369.

Hapiot P, Pinson J, Neta P, Francesch C, Mhamdi F, Rolando C y Schneider S. 1994. Mechanism of oxidative coupling of coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 36: 1013-1020.

Hazlewood GP y Gilbert HJ. 1998. Structure and function analysis of *Pseudomonas* plant cell wall hydrolases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 211-241.

Henfling, J. W. 1987. El Tizón Tardío de la Papa *Phytophthora infestans*. 2ª ed. Centro Internacional de la Papa, Perú (Boletín de Información Tecnica No. 4) 25p.

Hendriks T y van Loon LC. 1990. Petunia peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. J Plant Physiol 136: 519-525.

Heredia A, Jimenez A y Guillen R. 1995. Composition of plant cell walls. Z Lebensm Unters Forsch 200: 24-31.

Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P y Sandberg G. 2001. A transcriptional roadmap to wood formation. Proc Natl Acad Sci USA 98: 14732-14737.

Higuchi T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. Wood Sci Technol 24: 23-63.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y y Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiol. 42:462-468.

Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T y Ohashi Y. 2000. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase gene. FEBS Letters 471: 245-250.

Hoyle MC. 1977. High resolution of peroxidase-indolacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. Plant Physiol 60: 787-793.

Ikegawa T, Mayama S, Nakayashiki H y Kato H. 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. Physiol Mol Plant Pathol 48: 245-255.

Jamet E, Canut H, Boudart G y Pont-Lezica RF. 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. Trends Plant Sci 11: 33-39.

Jimenez A, Hernandez J. A., Del Rio L.A., Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284.

Jankiewicz L. S. y Sobiczewski P. 2003. Las fitoalexinas y otras sustancias relacionadas con la Resistencia de las plantas a los patógenos. *In*: L. S. Jankiewicz (ed.). *Reguladores del Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Volumen I Propiedades y acción.* Ed. Mundi- Prensa. Madrid, España. Pp. 427-464.

Jespersen HM, Kjaersgard IV, Østergaard L y Welinder KG. 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J* 326: 305-310.

Jiménez-Díaz, R.M. 2000, Interacciones planta-hongo: Mecanismos de infección, Patogénesis y Resistencia. En *Patología Vegetal*. Editores: Llacer G., López M.M., Trapero a., Bello A. España, pp 739-769.

Jones L, Ennos AR y Turner SR. 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutante of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 26: 205-216.

Kamoun S., Hraber, P., Sobral, B., Nuss D. and Govers, F. Initial Assesment of Gene Diversity for the Oomycete pathogen *Phytophthora infestans* Based of Expressed Sequences. *Fungal genetics and Biology.* 28: 94-106.

Kärkönen A, Koutaniemi S, Mustonen M, Syrjänen K, Brunow G, Kilpeläinen I, Teeri TH y Simola LK. 2002. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiol Plant* 114: 343-353.

Keller B. 1994. Gene expression of plant extracellular proteins. En "Genetic Engineering" (Setlow JK ed) 16:255-270, New York, Plenum Press.

Kessman, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, G., Ward, E., Uknes, S., Ryals, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 439-460.

Kloepper, J.W., Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. pp 879-882. *Proc. 4th Int'l. Conf. Plant Pathogenic Bact.* Gilbert-Clarey, Tours, Francia.

Kretschmann D. 2003. The remarkable deformability of wood in a moist environment resembles that of ductile metals. A combination of traditional mechanical tests and cutting-edge diffraction experiments reveal the molecular mechanism that determines such behaviour. *Nat Mat* 2: 775-776.

Kristensen BK, Bloch H y Rasmussen SK. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiol* 120: 501-512.

Kozela C y Regan S. 2003. How plants make tubes. *Trends Plant Sci* 8: 159-164.

Lagrimini LM. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* 96: 577-583.

Lawton M. A. and Lamb C. J. 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Mol. Cell Biol.* 7:335-341.

Lewis NG y Yamamoto E. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.

Lozoya- Saldaña H. y Hernandez-Vilchis A. 2001. Compuestos registrados y de la sección 18 para el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De By) en papa en Toluca, México. *Agrociencia* 35:451-458.

Lozoya- Saldaña, H., Almanza Serrano M.G. Colinas L.M.T. 2006. Infección Mixta *Phytophthora Infestans*- Virus X de la Papa (PVX) y Mecanismos de Defensa en Papa (*Solanum Tuberosum*) Agrociencia, Colegio de Postgraduados. Texcoco, México, pp. 753-764.

Liu L, Dean JFD, Friedman WE y Eriksson KEL. 1995. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. Plant J 6: 213-224.

Lyon G. D. and Albersheim A. 1982. Host- pathogen interactions XXI. Extraction of a heat-labile elicitor of phttoalexin accumulation from frozen soybean stems. Plant Physiol. 70:406-409.

Lynn D. G. and Chang M. 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol. 41:497-526.

Manibhushanrao K., Mohammed Z., and N. Matsuyama. 1988. Phenol Metabolism and Plant Disease Resistance. Acta Phytopathol. Et Entomol. Hungarica 23: 103-114.

Martínez- Tellez M. A. and Lafuente M. T. 1997. Effect of high temperatura conditioning of ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune marduly fruit. J. Plant Physiol. 150: 674-678.

Matlok J, Krzakowa M, y Rudolph H. 1989. Peroxidase patterns in Bryophytes: a critical evaluation. J Hattori Bot Lab 67: 407-414.

McDougall GJ. 1992. Changes in the cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. Phytochemistry 31: 3385-3389.

McEldeen JP y Dordick JS. 1996. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. Biotechnol Prog 12: 555-558.

Minic Z y Jouanin L. 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. Plant Physiol Biochem 44: 435-449.

Monk LS., Fagerstedt KV., Crawford RM.1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant enzymes in physiological stres. Physiol Plant 76: 456-459.

Motose H, Fukuda H y Sugiyama M. 2001. Involvement of local intercellular communication in the differentiation of zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Planta* 213: 121-131.

Mucharromah, H.R. Burton and J. Kué. 1995. The effect of sterols on phytoalexin, steroid glycoalkaloid, and sterol accumulation in potato tuber discs inoculated with *Phytophthora infestans* or treated with arachidonic acid. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 47: 13-27.

Navarrete, R., and D. Mayo. 2004. Analisis of systemic acquired resistance in potato. *Am J Potato Res* 81: 76

Northcote DH. 1995. Aspects of vascular tissue differentiation in plants: parameters that may be used to monitor the process. *Int J Plant Sci* 156: 145-156.

Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL y Lewis NG. 1995. Towards the specification of consecutive steps in macro-molecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71- 79.

Okinawa Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, *et al.* A Structural Model for the Mechanisms of Elicitor Release From Fungal Cell Walls by Plant beta-1, 3-Endoglucanase. *Plant Physiol.* 1995; 109:839-845.

O'Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL y Sederoff RR. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant J* 4: 751-757.

Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Uría MA, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ y de Miguel MP. 1997. *Citología e histología vegetal y animal*. Ed McGraw-Hill Interamericana.

Passardi F, Penel C y Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534-540.

Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.



Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R y Ros Barceló A. 1993. A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* and *Leguminosae*. En *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, eds KJ Welinder, SK Rasmussen, C Penel y H Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra pp 307-314.

Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M y Goffner D. 2005. Novel markers of xylogenesis in *Zinnia* are differentially regulated by auxin and cytokinin. *Plant Physiol* 139: 1821-1839.

Polle A, Otter T y Seifert F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60.

Popper ZA y Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann Bot* 91:1-12.

Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H y Valpuesta V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.

Rabilloud T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics* 2: 3-10.

Raven P. H., Evert R. F. and Eichhorn S. E. 1999. *Biology of Plants*. Six Edition. New York. W H Freeman and Company. 944 pp. 370.

Robinson R. A. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: P. F. Fox (ed.). *Food enzymology*. Vol. 1- Elsevier, London. pp. 399-426.

Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.

- Ros Barceló A y Pomar F. 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry* 57: 1105-1113.
- Ryals J., Uknes S. and E. Ward. 1994. Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* 104: 1109-1112.
- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43:439-463.
- Salisbury F. B. y Ross C W. 1994. Fisiología vegetal. Grupo editorial Iberoamericana. México, D. F. 759 p.
- Sánchez-Romero C, García-Gómez ML, Pliego-Alfaro F y Heredia A. 1994. Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol Plant* 92: 97-101.
- Saniewski M. 1995. Metyl jasmonate in relation to ethylene production and other physiological processes in selected horticultural crops. *Acta Horticulturae* 394: 85-98.
- Samuels AL, Rensing KH, Douglas CJ, Mansfield SD, Dharmawardhana DP y Ellis BE. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216: 72-82.
- Sato Y, Sugiyama M, Takagi T y Fukuda H. 1995b. Purification of cationic peroxidases bound ionically to the cell walls from the roots of *Zinnia elegans*. *J Plant Res* 108: 463-468.
- Scandalios JG. 1997. Oxygen stres and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Shiraishi T., Yamada T., Nicholson R. L., and Kunoh H. 1995. Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* (race1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 46: 153-162.

Siegel BZ. 1993. Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regul* 12: 303-312.

Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H y Lamport DTA. 1996. Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J* 9: 477-489.

Smart C.D., Sandrock, R. W. and Fry R. 2000 Molecular Techniques and Mystery of the Potato Late Blight pathogen. *Plant Microbe Interactions*. Vol. 5. Edited by Gary Stacey and Noel Keen 336p. APS (American Phytopathology Society Press. St Paul Mn. U.S.A P:21-41.

Schultz CJ, Ferguson KL, Lahnstein J y Bacic A. 2004. Post-translational modifications of arabinogalactan- peptides of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 45503-45511.

Sottomayor M y Ros Barceló A. 1997. What can we learn from  $\alpha$ -3', 4'-anhydrovinblastine synthase Recent Res Develop Phytochem Vol I, SG Pandalai, ed Research Signpost, India 1: 225-233.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedermann Merdinoglu S, Kauffman S, Greoffroy P, *et al*. Plant "Pathogenesis-related" Proteins and Their Role in Defence Against Pathogens. *Biochimie*. 1993; 75:687-706.

Tams JW y Welinder KG. 1995. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem* 228: 48-55.

Takahama U. 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolic by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 34: 809-817.

Tognolli M, Penel C, Greppin H y Simon P. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.

Trujillo, A., Navia O., J. Gandarillas A. Fernandez E., Northcote E., 2001. Utilización de un activador de resistencia en estrategias de control químico del tizon de la papa (*Phytophthora infestans*) en los Andes. Febrero 13-16, 2001, Cochabamba, Bolivia. P. 5.

Tsang EWT., Bowler C., Hérouart D, Van Camp W, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inze D., 1991. Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792.

Ubeda-Tomas S, Edvardsson E, Eland C, Kumar Singh S, Zadik D, Aspeborg H, Gorzsás A, Teeri TT, Sundberg B, Persson P, Bennett M y Marchant A. 2007. Genomic-assisted identification of genes involved in secondary growth in *Arabidopsis* utilising transcript profiling of poplar wood-forming tissues. *Physiol Plantarum* 129: 415-428.

Vanden Driessche T, Kevers C, Gaspar T y Caubergs R. 1984. Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27: 175-181.

Veitch NC. 2004. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Rev* 3: 3-18.

Vidhyasekaran P. 1988. Physiology of disease resistance in plants. Vol. II CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. P.128.

Vitale A y Denecke J. 1999. The endoplasmic reticulum—gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11: 615-628.

Von Heijne G. 1990. The signal peptide. *J Membr Biol* 115: 195-201.

Varner JE y Lin LS. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.

Way H. M., Kasan K., Mitter N., Kenneth G., Birch G. R. and Manners J. M. 2000. Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-Lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 60:275-282.

Weger HG. 1997. Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46: 195-201.

Welinder K. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.

Yang BY, Gray JSS y Montgomery R. 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res* 287: 203-212.

Yokoyama R y Nishitani K. 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls. *J Plant Res* 119: 189-194.

Zhong R, Taylor JJ y Ye ZH. 1997. Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 9: 2159-2170.

## 8. APENDICES

**Cuadro No. 1. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla y al follaje del producto Amistar (Azoxystrobin).**

| Planta | Tratamiento | Surco 1 |       |       |       |       | Surco 2 |       |       |       |       |
|--------|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1   | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1   | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | AMISTAR     | 0       | 5     | 30    | 50    | 70    | 5       | 30    | 55    | 70    | 100   |
| 2      | AMISTAR     | 0       | 5     | 30    | 50    | 90    | 0       | 15    | 60    | 75    | 100   |
| 3      | AMISTAR     | 0       | 5     | 15    | 35    | 50    | 0       | 15    | 70    | 75    | 95    |
| 4      | AMISTAR     | 0       | 5     | 15    | 40    | 75    | 0       | 10    | 55    | 70    | 70    |
| 5      | AMISTAR     | 0       | 0     | 10    | 30    | 70    | 10      | 15    | 35    | 50    | 75    |
| 6      | AMISTAR     | 0       | 0     | 10    | 30    | 80    | 5       | 10    | 30    | 55    | 90    |
| 7      | AMISTAR     | 0       | 0     | 10    | 40    | 65    | 5       | 15    | 35    | 50    | 70    |
| 8      | AMISTAR     | 0       | 0     | 10    | 35    | 70    | 0       | 10    | 30    | 50    | 75    |
| 9      | AMISTAR     | 5       | 15    | 30    | 45    | 70    | 0       | 10    | 35    | 50    | 70    |
| 10     | AMISTAR     | 0       | 5     | 15    | 40    | 70    | 0       | 15    | 35    | 55    | 55    |
| 11     | AMISTAR     | 0       | 5     | 10    | 50    | 80    | 5       | 10    | 30    | 50    | 50    |
| 12     | AMISTAR     | 5       | 5     | 10    | 50    | 75    | 5       | 15    | 35    | 55    | 70    |
| 13     | AMISTAR     | 5       | 10    | 40    | 70    | 95    | 5       | 30    | 50    | 70    | 80    |
| 14     | AMISTAR     | 5       | 10    | 40    | 50    | 80    | 0       | 30    | 50    | 75    | 85    |
| 15     | AMISTAR     | 5       | 10    | 30    | 45    | 70    | 0       | 35    | 55    | 80    | 90    |
| 16     | AMISTAR     | 5       | 10    | 30    | 40    | 55    | 0       | 30    | 50    | 75    | 95    |
| 17     | AMISTAR     | 0       | 5     | 30    | 50    | 70    | 5       | 30    | 50    | 80    | 100   |
| 18     | AMISTAR     | 0       | 5     | 30    | 55    | 70    | 5       | 15    | 35    | 70    | 100   |
| 19     | AMISTAR     | 0       | 5     | 15    | 30    | 50    | 5       | 15    | 35    | 50    | 70    |
| 20     | AMISTAR     | 0       | 0     | 10    | 30    | 50    | 5       | 15    | 40    | 50    | 80    |
| 21     | AMISTAR     | 5       | 5     | 30    | 30    | 50    | 0       | 15    | 30    | 70    | 85    |
| 22     | AMISTAR     | 5       | 5     | 30    | 35    | 60    | 0       | 10    | 40    | 70    | 80    |
| 23     | AMISTAR     | 5       | 10    | 40    | 70    | 90    | 0       | 10    | 30    | 55    | 75    |
| 24     | AMISTAR     | 0       | 10    | 30    | 50    | 85    | 0       | 10    | 35    | 55    | 75    |
| 25     | AMISTAR     | 0       | 0     | 15    | 50    | 80    | 0       | 10    | 30    | 75    | 95    |
| 26     | AMISTAR     | 0       | 5     | 10    | 30    | 70    | 5       | 10    | 35    | 75    | 100   |
| 27     | AMISTAR     | 5       | 5     | 10    | 35    | 80    | 5       | 15    | 30    | 70    | 85    |
| 28     | AMISTAR     | 5       | 10    | 40    | 50    | 80    | 5       | 15    | 35    | 75    | 90    |
| 29     | AMISTAR     | 5       | 10    | 40    | 55    | 75    | 0       | 5     | 15    | 35    | 55    |
| 30     | AMISTAR     | 5       | 10    | 30    | 50    | 85    | 0       | 5     | 15    | 35    | 50    |

**Cuadro No. 2. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla y al follaje del producto CABRIO-C (CABRIO 20 EG ® + Boscalid).**

| Planta | Tratamiento | Surco 3 |       |       |       |       | Surco 4 |       |       |       |       |
|--------|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1   | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1   | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | CABRIO-C    | 0       | 10    | 15    | 35    | 55    | 10      | 30    | 35    | 55    | 90    |
| 2      | CABRIO-C    | 0       | 15    | 30    | 35    | 50    | 0       | 15    | 50    | 70    | 95    |
| 3      | CABRIO-C    | 0       | 5     | 10    | 15    | 35    | 0       | 15    | 30    | 50    | 70    |
| 4      | CABRIO-C    | 5       | 10    | 15    | 35    | 50    | 0       | 10    | 30    | 55    | 75    |
| 5      | CABRIO-C    | 0       | 5     | 10    | 30    | 55    | 5       | 15    | 35    | 55    | 70    |
| 6      | CABRIO-C    | 0       | 15    | 30    | 50    | 70    | 0       | 5     | 15    | 35    | 55    |
| 7      | CABRIO-C    | 5       | 10    | 15    | 30    | 50    | 10      | 15    | 30    | 50    | 55    |
| 8      | CABRIO-C    | 10      | 15    | 30    | 35    | 50    | 10      | 10    | 30    | 35    | 50    |
| 9      | CABRIO-C    | 5       | 10    | 15    | 30    | 50    | 10      | 15    | 15    | 30    | 35    |
| 10     | CABRIO-C    | 5       | 10    | 30    | 35    | 55    | 5       | 10    | 15    | 15    | 35    |
| 11     | CABRIO-C    | 0       | 10    | 35    | 50    | 70    | 5       | 10    | 30    | 35    | 50    |
| 12     | CABRIO-C    | 0       | 15    | 30    | 50    | 70    | 5       | 10    | 35    | 35    | 55    |
| 13     | CABRIO-C    | 0       | 10    | 15    | 50    | 75    | 0       | 15    | 35    | 50    | 70    |
| 14     | CABRIO-C    | 0       | 10    | 30    | 55    | 70    | 0       | 10    | 30    | 30    | 55    |
| 15     | CABRIO-C    | 0       | 5     | 10    | 30    | 55    | 0       | 15    | 30    | 35    | 55    |
| 16     | CABRIO-C    | 5       | 10    | 15    | 30    | 50    | 5       | 10    | 15    | 30    | 50    |
| 17     | CABRIO-C    | 5       | 10    | 10    | 30    | 50    | 0       | 5     | 15    | 35    | 50    |
| 18     | CABRIO-C    | 0       | 5     | 15    | 15    | 35    | 0       | 10    | 15    | 30    | 55    |
| 19     | CABRIO-C    | 0       | 5     | 10    | 10    | 35    | 5       | 15    | 30    | 50    | 70    |
| 20     | CABRIO-C    | 0       | 10    | 30    | 35    | 50    | 5       | 10    | 35    | 55    | 70    |
| 21     | CABRIO-C    | 0       | 5     | 10    | 30    | 55    | 5       | 10    | 50    | 55    | 75    |
| 22     | CABRIO-C    | 0       | 5     | 15    | 50    | 70    | 5       | 10    | 15    | 35    | 55    |
| 23     | CABRIO-C    | 5       | 15    | 30    | 50    | 75    | 0       | 5     | 15    | 30    | 55    |
| 24     | CABRIO-C    | 10      | 30    | 50    | 70    | 90    | 0       | 5     | 10    | 15    | 35    |
| 25     | CABRIO-C    | 10      | 35    | 55    | 70    | 75    | 0       | 5     | 15    | 15    | 35    |
| 26     | CABRIO-C    | 10      | 30    | 50    | 55    | 70    | 0       | 5     | 10    | 30    | 50    |
| 27     | CABRIO-C    | 10      | 15    | 35    | 55    | 70    | 10      | 15    | 30    | 30    | 50    |
| 28     | CABRIO-C    | 15      | 30    | 35    | 50    | 70    | 10      | 30    | 30    | 35    | 50    |
| 29     | CABRIO-C    | 5       | 15    | 30    | 50    | 55    | 10      | 15    | 35    | 35    | 50    |
| 30     | CABRIO-C    | 5       | 10    | 15    | 35    | 50    | 5       | 15    | 30    | 30    | 55    |

**Cuadro No. 3. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla y al follaje del producto CABRIO 20 EG ® (CABRIO 20 EG ®).**

| Planta | Tratamiento    | Surco 5    |           |           |           |           | Surco 6   |           |           |           |           |
|--------|----------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|        |                | Se<br>m. 1 | Sem.<br>2 | Sem.<br>3 | Sem.<br>4 | Sem.<br>5 | Sem.<br>1 | Sem.<br>2 | Sem.<br>3 | Sem.<br>4 | Sem.<br>5 |
| 1      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 30        | 50        | 80        | 5         | 30        | 35        | 50        | 75        |
| 2      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 35        | 50        | 75        | 10        | 15        | 35        | 55        | 80        |
| 3      | CABRIO 20 EG ® | 5          | 15        | 30        | 55        | 75        | 10        | 30        | 50        | 70        | 100       |
| 4      | CABRIO 20 EG ® | 5          | 10        | 30        | 50        | 70        | 5         | 15        | 35        | 55        | 80        |
| 5      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 35        | 35        | 55        | 5         | 10        | 30        | 50        | 75        |
| 6      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 30        | 35        | 50        | 5         | 15        | 35        | 55        | 75        |
| 7      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 30        | 35        | 50        | 5         | 10        | 35        | 50        | 75        |
| 8      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 30        | 30        | 50        | 0         | 15        | 30        | 50        | 70        |
| 9      | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 35        | 50        | 75        | 0         | 10        | 30        | 55        | 75        |
| 10     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 30        | 55        | 75        | 0         | 15        | 35        | 35        | 50        |
| 11     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 35        | 50        | 70        | 0         | 10        | 30        | 30        | 50        |
| 12     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 30        | 55        | 80        | 0         | 15        | 35        | 50        | 70        |
| 13     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 35        | 50        | 80        | 0         | 10        | 50        | 55        | 80        |
| 14     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 35        | 55        | 75        | 0         | 15        | 35        | 55        | 75        |
| 15     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 35        | 50        | 70        | 0         | 10        | 35        | 50        | 75        |
| 16     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 30        | 55        | 70        | 0         | 30        | 50        | 70        | 100       |
| 17     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 35        | 35        | 55        | 10        | 35        | 55        | 75        | 100       |
| 18     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 30        | 35        | 55        | 10        | 30        | 55        | 70        | 80        |
| 19     | CABRIO 20 EG ® | 10         | 15        | 35        | 50        | 50        | 10        | 30        | 50        | 70        | 90        |
| 20     | CABRIO 20 EG ® | 10         | 15        | 30        | 30        | 50        | 10        | 30        | 55        | 70        | 95        |
| 21     | CABRIO 20 EG ® | 10         | 30        | 35        | 50        | 70        | 10        | 30        | 50        | 55        | 70        |
| 22     | CABRIO 20 EG ® | 10         | 30        | 50        | 55        | 70        | 10        | 35        | 50        | 55        | 70        |
| 23     | CABRIO 20 EG ® | 5          | 35        | 55        | 55        | 75        | 15        | 30        | 50        | 55        | 75        |
| 24     | CABRIO 20 EG ® | 5          | 30        | 35        | 50        | 75        | 15        | 35        | 55        | 70        | 80        |
| 25     | CABRIO 20 EG ® | 5          | 35        | 50        | 55        | 80        | 15        | 30        | 50        | 55        | 85        |
| 26     | CABRIO 20 EG ® | 5          | 30        | 35        | 55        | 80        | 10        | 30        | 35        | 55        | 70        |
| 27     | CABRIO 20 EG ® | 5          | 15        | 35        | 50        | 85        | 10        | 35        | 50        | 55        | 70        |
| 28     | CABRIO 20 EG ® | 5          | 15        | 35        | 55        | 90        | 10        | 30        | 35        | 55        | 80        |
| 29     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 10        | 35        | 70        | 90        | 10        | 35        | 50        | 55        | 70        |
| 30     | CABRIO 20 EG ® | 0          | 15        | 30        | 55        | 90        | 5         | 30        | 55        | 55        | 70        |



**Cuadro No. 4. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla y al follaje del producto ALIETTE (Fosetil AL).**

| Planta | Tratamiento | Surco 7 |       |       |       |       | Surco 8 |       |       |       |       |
|--------|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1   | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1   | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | ALIETTE     | 0       | 5     | 15    | 35    | 50    | 0       | 10    | 15    | 30    | 55    |
| 2      | ALIETTE     | 0       | 10    | 15    | 30    | 50    | 0       | 10    | 30    | 50    | 55    |
| 3      | ALIETTE     | 0       | 10    | 15    | 35    | 50    | 0       | 10    | 35    | 50    | 70    |
| 4      | ALIETTE     | 0       | 15    | 30    | 50    | 70    | 0       | 15    | 35    | 55    | 70    |
| 5      | ALIETTE     | 5       | 15    | 30    | 50    | 70    | 0       | 15    | 15    | 30    | 50    |
| 6      | ALIETTE     | 5       | 10    | 35    | 55    | 75    | 5       | 10    | 30    | 35    | 55    |
| 7      | ALIETTE     | 5       | 15    | 30    | 55    | 80    | 5       | 10    | 35    | 50    | 70    |
| 8      | ALIETTE     | 10      | 15    | 35    | 50    | 80    | 5       | 15    | 30    | 35    | 55    |
| 9      | ALIETTE     | 10      | 35    | 50    | 70    | 95    | 5       | 10    | 35    | 50    | 70    |
| 10     | ALIETTE     | 15      | 35    | 55    | 75    | 90    | 5       | 15    | 30    | 50    | 70    |
| 11     | ALIETTE     | 15      | 35    | 55    | 70    | 90    | 5       | 15    | 35    | 55    | 70    |
| 12     | ALIETTE     | 10      | 35    | 55    | 75    | 100   | 5       | 10    | 35    | 35    | 55    |
| 13     | ALIETTE     | 10      | 30    | 35    | 35    | 50    | 5       | 15    | 30    | 35    | 55    |
| 14     | ALIETTE     | 10      | 35    | 35    | 50    | 50    | 5       | 10    | 35    | 35    | 55    |
| 15     | ALIETTE     | 10      | 30    | 35    | 50    | 50    | 5       | 15    | 30    | 35    | 50    |
| 16     | ALIETTE     | 10      | 35    | 50    | 55    | 70    | 0       | 15    | 30    | 50    | 75    |
| 17     | ALIETTE     | 5       | 15    | 35    | 55    | 75    | 0       | 15    | 50    | 70    | 90    |
| 18     | ALIETTE     | 5       | 30    | 35    | 55    | 70    | 0       | 30    | 55    | 70    | 90    |
| 19     | ALIETTE     | 5       | 35    | 50    | 55    | 70    | 5       | 35    | 55    | 75    | 95    |
| 20     | ALIETTE     | 5       | 30    | 35    | 35    | 55    | 5       | 30    | 55    | 75    | 100   |
| 21     | ALIETTE     | 0       | 15    | 30    | 35    | 55    | 5       | 35    | 50    | 70    | 100   |
| 22     | ALIETTE     | 0       | 15    | 35    | 55    | 70    | 10      | 35    | 55    | 75    | 95    |
| 23     | ALIETTE     | 10      | 30    | 50    | 55    | 70    | 10      | 35    | 55    | 70    | 95    |
| 24     | ALIETTE     | 10      | 35    | 55    | 55    | 75    | 10      | 30    | 50    | 75    | 90    |
| 25     | ALIETTE     | 10      | 35    | 50    | 55    | 75    | 10      | 30    | 55    | 70    | 90    |
| 26     | ALIETTE     | 5       | 15    | 30    | 30    | 55    | 10      | 15    | 30    | 50    | 75    |
| 27     | ALIETTE     | 5       | 30    | 35    | 35    | 55    | 10      | 30    | 35    | 55    | 75    |
| 28     | ALIETTE     | 5       | 30    | 50    | 50    | 55    | 15      | 35    | 50    | 55    | 75    |
| 29     | ALIETTE     | 5       | 35    | 55    | 55    | 70    | 15      | 30    | 35    | 55    | 70    |
| 30     | ALIETTE     | 0       | 15    | 35    | 50    | 70    | 10      | 35    | 50    | 55    | 70    |

**Cuadro No. 5. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla Amistar (Azoxystrobin).**

| Planta | Tratamiento | Surco 13 |       |       |       |       | Surco 14 |       |       |       |       |
|--------|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | Amistar     | 5        | 35    | 50    | 75    | 100   | 0        | 30    | 55    | 75    | 95    |
| 2      | Amistar     | 5        | 50    | 55    | 75    | 100   | 0        | 30    | 50    | 70    | 100   |
| 3      | Amistar     | 5        | 55    | 70    | 75    | 95    | 0        | 35    | 50    | 75    | 100   |
| 4      | Amistar     | 0        | 50    | 55    | 70    | 90    | 5        | 50    | 70    | 90    | 100   |
| 5      | Amistar     | 0        | 35    | 55    | 75    | 95    | 5        | 50    | 75    | 95    | 100   |
| 6      | Amistar     | 0        | 35    | 55    | 70    | 90    | 5        | 50    | 75    | 90    | 95    |
| 7      | Amistar     | 0        | 35    | 50    | 75    | 90    | 5        | 15    | 50    | 70    | 100   |
| 8      | Amistar     | 0        | 30    | 55    | 70    | 95    | 5        | 30    | 50    | 75    | 95    |
| 9      | Amistar     | 0        | 30    | 50    | 75    | 90    | 5        | 35    | 55    | 70    | 90    |
| 10     | Amistar     | 0        | 35    | 55    | 70    | 100   | 10       | 30    | 55    | 75    | 100   |
| 11     | Amistar     | 0        | 50    | 70    | 90    | 100   | 15       | 55    | 70    | 90    | 100   |
| 12     | Amistar     | 10       | 30    | 50    | 85    | 100   | 10       | 50    | 75    | 90    | 90    |
| 13     | Amistar     | 10       | 35    | 55    | 90    | 95    | 15       | 35    | 80    | 95    | 95    |
| 14     | Amistar     | 10       | 50    | 70    | 80    | 80    | 10       | 50    | 85    | 95    | 100   |
| 15     | Amistar     | 10       | 55    | 75    | 80    | 85    | 10       | 50    | 75    | 90    | 100   |
| 16     | Amistar     | 10       | 35    | 70    | 85    | 100   | 5        | 15    | 50    | 85    | 100   |
| 17     | Amistar     | 5        | 50    | 75    | 90    | 95    | 5        | 15    | 70    | 90    | 90    |
| 18     | Amistar     | 5        | 50    | 75    | 90    | 90    | 10       | 30    | 50    | 75    | 90    |
| 19     | Amistar     | 5        | 35    | 55    | 75    | 100   | 10       | 35    | 55    | 75    | 100   |
| 20     | Amistar     | 5        | 35    | 50    | 70    | 100   | 5        | 50    | 70    | 85    | 100   |
| 21     | Amistar     | 5        | 30    | 55    | 75    | 100   | 5        | 35    | 55    | 80    | 100   |
| 22     | Amistar     | 5        | 35    | 70    | 80    | 95    | 5        | 30    | 70    | 75    | 90    |
| 23     | Amistar     | 0        | 30    | 55    | 75    | 90    | 0        | 30    | 50    | 75    | 80    |
| 24     | Amistar     | 0        | 30    | 50    | 70    | 85    | 0        | 35    | 55    | 70    | 75    |
| 25     | Amistar     | 0        | 35    | 55    | 70    | 85    | 0        | 30    | 50    | 70    | 90    |
| 26     | Amistar     | 0        | 30    | 70    | 80    | 95    | 5        | 15    | 50    | 70    | 75    |
| 27     | Amistar     | 5        | 35    | 55    | 75    | 100   | 5        | 30    | 70    | 80    | 90    |
| 28     | Amistar     | 5        | 30    | 50    | 80    | 100   | 5        | 30    | 55    | 75    | 95    |
| 29     | Amistar     | 5        | 35    | 55    | 85    | 100   | 0        | 35    | 50    | 80    | 100   |
| 30     | Amistar     | 10       | 30    | 50    | 75    | 85    | 5        | 30    | 55    | 85    | 100   |

**Cuadro No. 6. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla del producto CABRIO-C (CABRIO 20 EG ® + Boscalid).**

| Planta | Tratamiento | Surco 15 |       |       |       |       | Surco 16 |       |       |       |       |
|--------|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | CABRIO      | 10       | 35    | 50    | 75    | 100   | 10       | 15    | 35    | 70    | 95    |
| 2      | CABRIO      | 10       | 35    | 55    | 80    | 90    | 5        | 15    | 50    | 75    | 90    |
| 3      | CABRIO      | 5        | 30    | 50    | 85    | 100   | 5        | 10    | 55    | 75    | 90    |
| 4      | CABRIO      | 5        | 15    | 35    | 55    | 95    | 5        | 10    | 35    | 80    | 95    |
| 5      | CABRIO      | 5        | 15    | 50    | 70    | 90    | 5        | 15    | 30    | 50    | 80    |
| 6      | CABRIO      | 0        | 15    | 55    | 75    | 85    | 10       | 30    | 55    | 70    | 85    |
| 7      | CABRIO      | 0        | 30    | 50    | 70    | 100   | 15       | 35    | 70    | 85    | 100   |
| 8      | CABRIO      | 0        | 15    | 35    | 55    | 100   | 15       | 35    | 55    | 75    | 90    |
| 9      | CABRIO      | 0        | 15    | 55    | 75    | 100   | 15       | 35    | 55    | 80    | 90    |
| 10     | CABRIO      | 5        | 15    | 35    | 70    | 100   | 10       | 30    | 50    | 75    | 85    |
| 11     | CABRIO      | 5        | 10    | 30    | 55    | 100   | 10       | 35    | 55    | 80    | 95    |
| 12     | CABRIO      | 5        | 10    | 35    | 55    | 100   | 10       | 30    | 55    | 85    | 100   |
| 13     | CABRIO      | 5        | 15    | 55    | 75    | 95    | 10       | 30    | 50    | 75    | 85    |
| 14     | CABRIO      | 0        | 35    | 50    | 70    | 100   | 15       | 35    | 55    | 80    | 90    |
| 15     | CABRIO      | 0        | 30    | 55    | 75    | 85    | 15       | 30    | 50    | 90    | 100   |
| 16     | CABRIO      | 0        | 30    | 50    | 70    | 90    | 10       | 35    | 55    | 75    | 100   |
| 17     | CABRIO      | 0        | 35    | 55    | 75    | 95    | 10       | 30    | 50    | 80    | 95    |
| 18     | CABRIO      | 5        | 30    | 35    | 70    | 95    | 5        | 30    | 55    | 75    | 90    |
| 19     | CABRIO      | 10       | 35    | 55    | 75    | 100   | 0        | 30    | 50    | 70    | 95    |
| 20     | CABRIO      | 0        | 30    | 70    | 80    | 100   | 0        | 35    | 55    | 75    | 90    |
| 21     | CABRIO      | 0        | 50    | 75    | 90    | 100   | 0        | 30    | 50    | 80    | 90    |
| 22     | CABRIO      | 0        | 50    | 55    | 70    | 100   | 5        | 15    | 55    | 70    | 85    |
| 23     | CABRIO      | 0        | 30    | 55    | 80    | 90    | 0        | 30    | 70    | 75    | 85    |
| 24     | CABRIO      | 5        | 15    | 35    | 55    | 95    | 0        | 35    | 75    | 75    | 80    |
| 25     | CABRIO      | 5        | 15    | 50    | 70    | 95    | 0        | 50    | 70    | 85    | 100   |
| 26     | CABRIO      | 5        | 30    | 55    | 75    | 100   | 0        | 30    | 55    | 75    | 100   |
| 27     | CABRIO      | 0        | 35    | 70    | 90    | 100   | 10       | 15    | 55    | 75    | 100   |
| 28     | CABRIO      | 0        | 30    | 55    | 75    | 100   | 10       | 35    | 70    | 90    | 95    |
| 29     | CABRIO      | 0        | 35    | 55    | 80    | 100   | 10       | 30    | 75    | 90    | 90    |
| 30     | CABRIO      | 5        | 30    | 70    | 85    | 100   | 10       | 35    | 55    | 75    | 95    |

**Cuadro No. 7. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla del producto CABRIO 20 EG ® (CABRIO 20 EG ®), algunas plantas sin emerger (s/e), en la primera semana.**

| Planta | Tratamiento    | Surco 17 |       |       |       |       | Surco 18 |       |       |       |       |
|--------|----------------|----------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
|        |                | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | CABRIO 20 EG ® | 0        | 15    | 50    | 70    | 100   | 0        | 30    | 55    | 75    | 100   |
| 2      | CABRIO 20 EG ® | 0        | 10    | 35    | 70    | 100   | 0        | 35    | 50    | 70    | 100   |
| 3      | CABRIO 20 EG ® | 0        | 10    | 30    | 75    | 95    | s/e      | 30    | 70    | 90    | 100   |
| 4      | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 30    | 50    | 90    | 95    | s/e      | 15    | 55    | 75    | 100   |
| 5      | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 35    | 55    | 90    | 95    | s/e      | 15    | 70    | 85    | 90    |
| 6      | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 30    | 50    | 75    | 90    | s/e      | 10    | 50    | 80    | 90    |
| 7      | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 15    | 35    | 55    | 90    | s/e      | 15    | 55    | 80    | 95    |
| 8      | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 10    | 50    | 70    | 100   | s/e      | 10    | 35    | 55    | 80    |
| 9      | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 15    | 55    | 75    | 100   | s/e      | 10    | 30    | 70    | 85    |
| 10     | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 30    | 50    | 70    | 100   | s/e      | 30    | 50    | 75    | 90    |
| 11     | CABRIO 20 EG ® | s/e      | 35    | 55    | 70    | 100   | s/e      | 15    | 30    | 70    | 90    |
| 12     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 30    | 50    | 75    | 100   | 5        | 15    | 35    | 55    | 95    |
| 13     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 50    | 70    | 75    | 95    | 0        | 10    | 35    | 50    | 95    |
| 14     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 55    | 70    | 90    | 90    | 0        | 15    | 50    | 70    | 90    |
| 15     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 30    | 55    | 75    | 90    | 0        | 10    | 70    | 80    | 90    |
| 16     | CABRIO 20 EG ® | 10       | 15    | 70    | 80    | 95    | 0        | 15    | 50    | 75    | 100   |
| 17     | CABRIO 20 EG ® | 10       | 30    | 55    | 75    | 95    | 0        | 10    | 35    | 55    | 100   |
| 18     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 35    | 70    | 90    | 90    | 10       | 15    | 55    | 70    | 100   |
| 19     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 30    | 75    | 90    | 95    | 10       | 30    | 50    | 75    | 95    |
| 20     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 35    | 70    | 95    | 100   | 0        | 35    | 55    | 80    | 100   |
| 21     | CABRIO 20 EG ® | 0        | 30    | 75    | 90    | 100   | 0        | 35    | 50    | 75    | 100   |
| 22     | CABRIO 20 EG ® | 0        | 35    | 55    | 75    | 95    | 0        | 30    | 55    | 70    | 100   |
| 23     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 30    | 55    | 70    | 95    | 0        | 15    | 35    | 55    | 100   |
| 24     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 15    | 55    | 70    | 90    | 0        | 15    | 30    | 70    | 100   |
| 25     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 10    | 35    | 55    | 80    | 5        | 10    | 35    | 55    | 95    |
| 26     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 15    | 50    | 70    | 85    | 5        | 30    | 50    | 70    | 95    |
| 27     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 30    | 55    | 75    | 100   | 5        | 35    | 50    | 75    | 100   |
| 28     | CABRIO 20 EG ® | 0        | 35    | 50    | 70    | 100   | 0        | 30    | 55    | 70    | 100   |
| 29     | CABRIO 20 EG ® | 0        | 15    | 50    | 70    | 100   | 0        | 35    | 55    | 75    | 95    |
| 30     | CABRIO 20 EG ® | 5        | 10    | 35    | 55    | 75    | 0        | 30    | 70    | 80    | 95    |

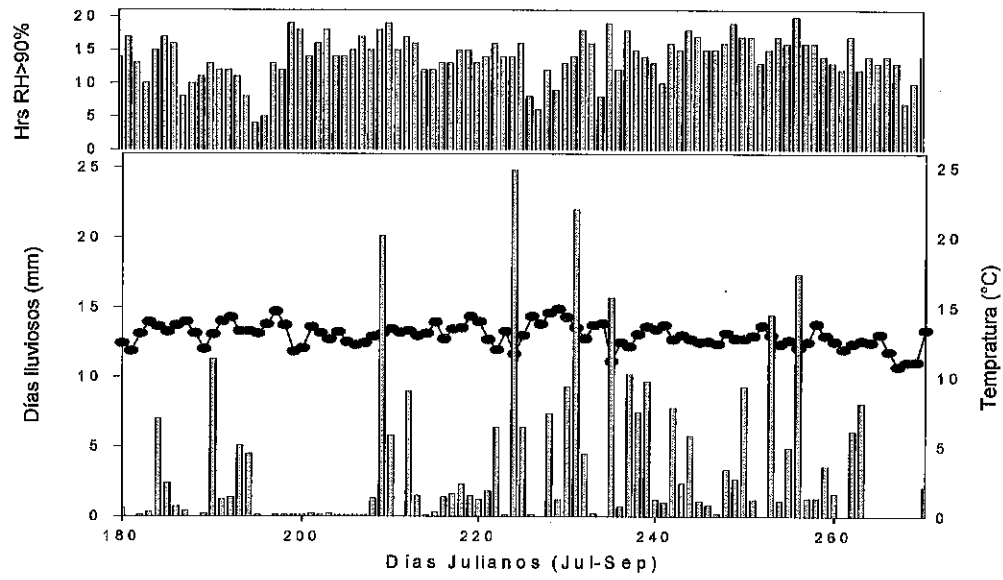
**Cuadro No. 8 Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, con el tratamiento químico a la semilla del producto ALIETTE (Fosetil AL).**

| Planta | Tratamiento | Surco 19 |       |       |       |       | Surco 20 |       |       |       |       |
|--------|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | ALIETTE     | 0        | 15    | 30    | 70    | 100   | 5        | 15    | 35    | 75    | 95    |
| 2      | ALIETTE     | 0        | 10    | 50    | 70    | 100   | 5        | 10    | 50    | 80    | 95    |
| 3      | ALIETTE     | 0        | 10    | 50    | 75    | 100   | 5        | 15    | 55    | 75    | 100   |
| 4      | ALIETTE     | 5        | 15    | 35    | 75    | 100   | 0        | 10    | 35    | 70    | 100   |
| 5      | ALIETTE     | 5        | 10    | 30    | 70    | 100   | 0        | 15    | 30    | 70    | 95    |
| 6      | ALIETTE     | 5        | 15    | 35    | 55    | 95    | 5        | 10    | 50    | 75    | 100   |
| 7      | ALIETTE     | 5        | 15    | 50    | 70    | 100   | 5        | 15    | 35    | 75    | 100   |
| 8      | ALIETTE     | 5        | 30    | 50    | 70    | 100   | 10       | 30    | 50    | 70    | 100   |
| 9      | ALIETTE     | 5        | 35    | 50    | 70    | 95    | 10       | 35    | 50    | 75    | 100   |
| 10     | ALIETTE     | 10       | 30    | 55    | 75    | 100   | 5        | 15    | 35    | 55    | 100   |
| 11     | ALIETTE     | 0        | 35    | 55    | 75    | 100   | 5        | 30    | 55    | 75    | 95    |
| 12     | ALIETTE     | 0        | 30    | 55    | 70    | 85    | 5        | 30    | 50    | 70    | 90    |
| 13     | ALIETTE     | 0        | 15    | 35    | 55    | 80    | 0        | 15    | 35    | 55    | 95    |
| 14     | ALIETTE     | 0        | 15    | 30    | 70    | 100   | 0        | 15    | 55    | 70    | 100   |
| 15     | ALIETTE     | 0        | 30    | 55    | 80    | 100   | 0        | 30    | 50    | 70    | 100   |
| 16     | ALIETTE     | 5        | 35    | 55    | 85    | 100   | 5        | 35    | 55    | 75    | 100   |
| 17     | ALIETTE     | 5        | 30    | 70    | 90    | 95    | 0        | 30    | 50    | 70    | 90    |
| 18     | ALIETTE     | 10       | 35    | 55    | 75    | 90    | 0        | 35    | 55    | 75    | 90    |
| 19     | ALIETTE     | 10       | 50    | 70    | 75    | 85    | 0        | 35    | 75    | 80    | 100   |
| 20     | ALIETTE     | 10       | 50    | 75    | 80    | 95    | 5        | 50    | 80    | 95    | 100   |
| 21     | ALIETTE     | 10       | 35    | 55    | 75    | 95    | 0        | 50    | 75    | 90    | 100   |
| 22     | ALIETTE     | 5        | 35    | 50    | 70    | 95    | 0        | 35    | 70    | 90    | 100   |
| 23     | ALIETTE     | 5        | 35    | 55    | 75    | 90    | 0        | 55    | 70    | 90    | 100   |
| 24     | ALIETTE     | 5        | 15    | 35    | 70    | 100   | 0        | 15    | 55    | 75    | 100   |
| 25     | ALIETTE     | 0        | 10    | 35    | 55    | 80    | 0        | 10    | 55    | 80    | 100   |
| 26     | ALIETTE     | 0        | 35    | 55    | 70    | 100   | 5        | 15    | 50    | 75    | 100   |
| 27     | ALIETTE     | 0        | 30    | 50    | 70    | 100   | 5        | 10    | 50    | 75    | 100   |
| 28     | ALIETTE     | 0        | 35    | 55    | 75    | 100   | 5        | 15    | 55    | 80    | 100   |
| 29     | ALIETTE     | 5        | 35    | 50    | 80    | 100   | 5        | 10    | 35    | 55    | 80    |
| 30     | ALIETTE     | 10       | 35    | 55    | 90    | 100   | 0        | 10    | 50    | 70    | 100   |

**Cuadro No. 9. Porcentajes de infección semanal provocados por el hongo fitopatígeno *Phytophthora infestans* en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad alfa, sin tratamiento químico a la semilla ni al follaje (testigo).**

| Planta | Tratamiento | Surco 21 |       |       |       |       | Surco 22 |       |       |       |       |
|--------|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
|        |             | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 | Sem.1    | Sem.2 | Sem.3 | Sem.4 | Sem.5 |
| 1      | testigo     | 0        | 35    | 50    | 100   | 100   | 5        | 50    | 70    | 90    | 100   |
| 2      | testigo     | 0        | 30    | 55    | 100   | 100   | 0        | 55    | 75    | 85    | 100   |
| 3      | testigo     | 0        | 35    | 70    | 100   | 100   | 0        | 70    | 80    | 95    | 100   |
| 4      | testigo     | 0        | 50    | 75    | 100   | 100   | 5        | 50    | 75    | 100   | 100   |
| 5      | testigo     | 0        | 55    | 80    | 100   | 100   | 5        | 55    | 80    | 100   | 100   |
| 6      | testigo     | 5        | 50    | 70    | 100   | 100   | 5        | 50    | 75    | 100   | 100   |
| 7      | testigo     | 5        | 55    | 80    | 100   | 100   | 5        | 55    | 80    | 100   | 100   |
| 8      | testigo     | 5        | 30    | 55    | 100   | 100   | 5        | 55    | 75    | 100   | 100   |
| 9      | testigo     | 0        | 35    | 70    | 100   | 100   | 0        | 50    | 70    | 100   | 100   |
| 10     | testigo     | 0        | 30    | 55    | 100   | 100   | 0        | 55    | 75    | 100   | 100   |
| 11     | testigo     | 0        | 35    | 55    | 100   | 100   | 5        | 35    | 70    | 100   | 100   |
| 12     | testigo     | 0        | 30    | 70    | 100   | 100   | 5        | 30    | 75    | 100   | 100   |
| 13     | testigo     | 10       | 35    | 75    | 100   | 100   | 10       | 30    | 75    | 100   | 100   |
| 14     | testigo     | 10       | 35    | 75    | 100   | 100   | 15       | 35    | 55    | 100   | 100   |
| 15     | testigo     | 10       | 55    | 70    | 100   | 100   | 10       | 35    | 75    | 100   | 100   |
| 16     | testigo     | 10       | 35    | 55    | 100   | 100   | 0        | 30    | 55    | 100   | 100   |
| 17     | testigo     | 5        | 50    | 70    | 95    | 100   | 0        | 35    | 55    | 95    | 100   |
| 18     | testigo     | 5        | 55    | 75    | 90    | 100   | 5        | 30    | 55    | 90    | 100   |
| 19     | testigo     | 5        | 55    | 75    | 100   | 100   | 5        | 35    | 55    | 100   | 100   |
| 20     | testigo     | 10       | 50    | 70    | 100   | 100   | 0        | 30    | 70    | 100   | 100   |
| 21     | testigo     | 10       | 55    | 75    | 100   | 100   | 0        | 35    | 75    | 100   | 100   |
| 22     | testigo     | 5        | 55    | 75    | 100   | 100   | 0        | 50    | 70    | 100   | 100   |
| 23     | testigo     | 5        | 50    | 70    | 100   | 100   | 5        | 35    | 55    | 100   | 100   |
| 24     | testigo     | 0        | 55    | 75    | 100   | 100   | 5        | 15    | 55    | 100   | 100   |
| 25     | testigo     | 0        | 50    | 70    | 100   | 100   | 5        | 30    | 80    | 100   | 100   |
| 26     | testigo     | 0        | 50    | 80    | 100   | 100   | 0        | 35    | 70    | 100   | 100   |
| 27     | testigo     | 5        | 55    | 75    | 100   | 100   | 0        | 35    | 70    | 100   | 100   |
| 28     | testigo     | 5        | 55    | 80    | 100   | 100   | 0        | 50    | 75    | 100   | 100   |
| 29     | testigo     | 5        | 50    | 85    | 100   | 100   | 0        | 50    | 80    | 100   | 100   |
| 30     | testigo     | 0        | 35    | 70    | 100   | 100   | 5        | 35    | 80    | 100   | 100   |

**APENDICE 2**  
**(DATOS DE CONDICIONES CLIMÁTICAS, JULIO a SEPTIEMBRE DE 2007)**



### APENDICE 3

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

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

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



#### APENDICE 4

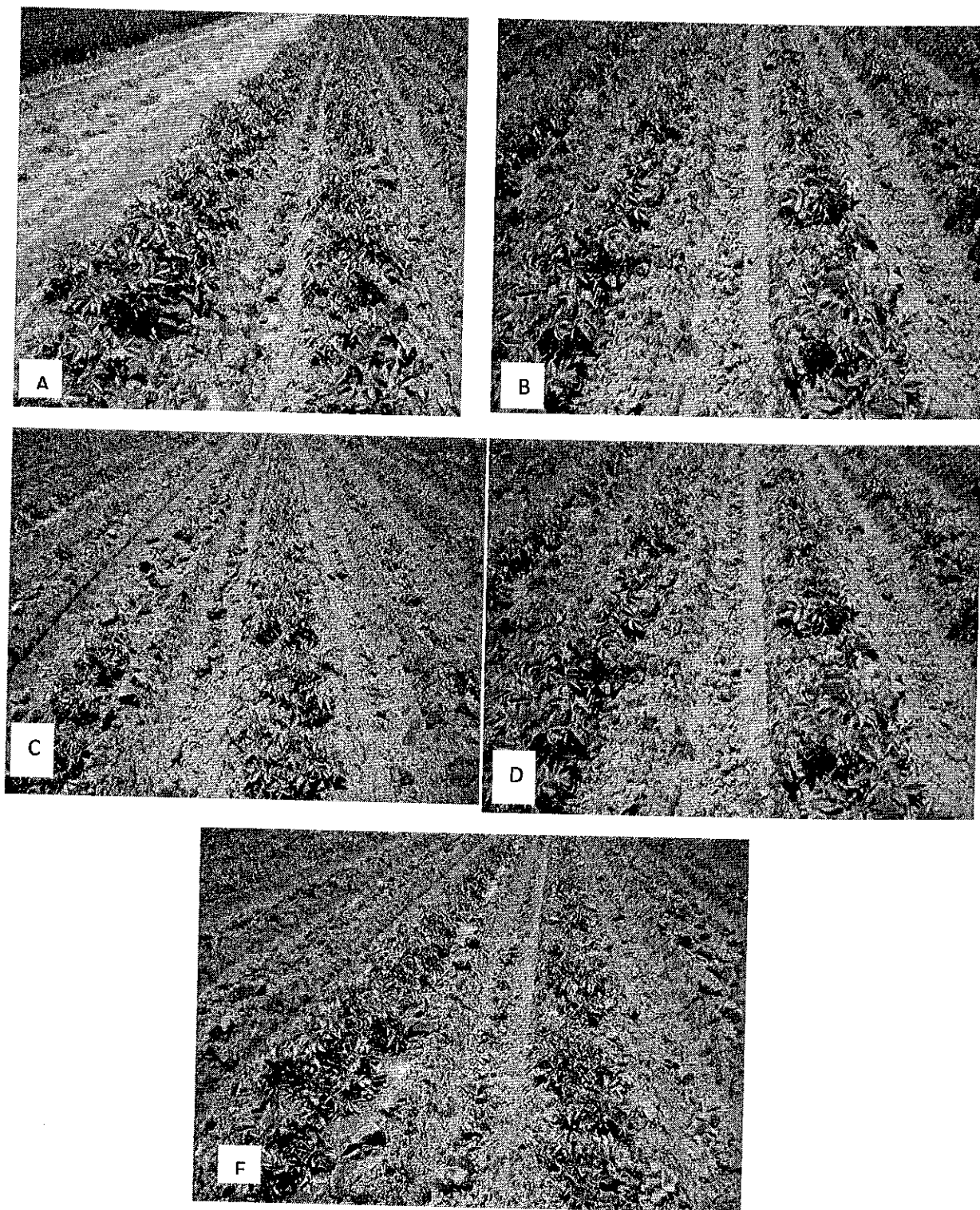
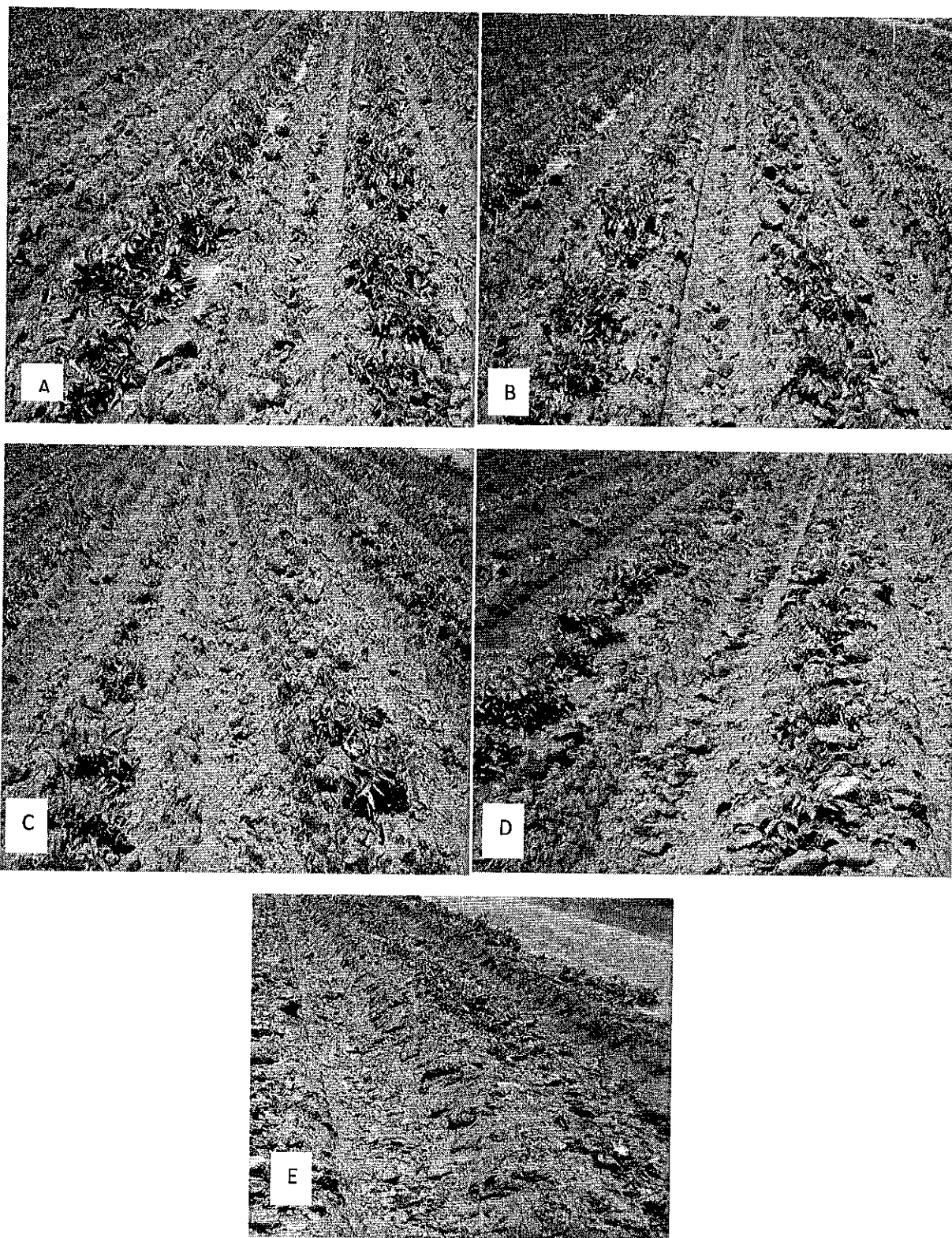


Figura 6. Tratamientos aplicados a la semilla y al follaje, durante la primera semana A) Surco 1 y 2, con el fungicida Amistar (Azoxystrobin), B) Surco 3 y 4 con el fungicida CABRIO-C (CABRIO 20 EG ® + Boscalid), C) Surco 5 y 6, con el fungicida CABRIO 20 EG ® (CABRIO 20 EG ®), D) Surco 7 y 8, con el fungicida ALIETTE (Fosetil AL), E) Surco 9 y 10 Testigo.



**Figura 7. Tratamientos aplicados a la semilla, durante la primera semana A) Surco 13 y 14, con el fungicida Amistar (Azoxystrobin), B) Surco 15 y 16 con el fungicida CABRIO-C (CABRIO 20 EG ® + Boscalid), C) Surco 17 y 18, con el fungicida CABRIO 20 EG ® (CABRIO 20 EG ®), D) Surco 19 y 20, con el fungicida ALIETTE (Fosetil AL), E) Surco 21 y 22 Testigo.**

APENDICE 5

Cuadro 2. Diferencias estadísticas entre medias entre los tratamientos (prueba de Tuckey  $\alpha=0.05$ )

|                              |                | CIFRAS FINALES |    |        |    |          |   |        |    |
|------------------------------|----------------|----------------|----|--------|----|----------|---|--------|----|
| TRAT.                        |                | FEN            | *  | POX    | *  | PAL      | * | SOD    | *  |
| A<br>semilla<br>y<br>Follaje | Azoxystrobin   | 1.9702         | A  | 3212.3 | A  | 0.09321  | A | 101.59 | A  |
|                              | Boscalid + PYR | 1.9646         | A  | 2438.2 | BA | 0.03087  | B | 75.84  | BA |
|                              | Pyraclostrobin | 1.8270         | A  | 2294.0 | BA | 0.02677  | B | 52.07  | BA |
|                              | Fosetil-Al     | 1.6742         | A  | 1733.1 | BA | 0.01988  | B | 13.85  | B  |
|                              | Testigo        | 1.6496         | A  | 1286.4 | B  | 0.01786  | B | 9.16   | B  |
|                              |                |                |    |        |    |          |   |        |    |
| Solo a<br>semilla            | Azoxystrobin   | 2.670          | A  | 3135   | A  | 0.04134  | A | 129.29 | A  |
|                              | Boscalid + PYR | 2.4853         | BA | 2884   | A  | 0.03455  | A | 111.74 | A  |
|                              | Pyraclostrobin | 2.0667         | BA | 2662   | A  | 0.034260 | A | 97.56  | A  |
|                              | Fosetil-Al     | 2.0357         | BA | 2394   | A  | 0.030703 | A | 77.95  | A  |
|                              | Testigo        | 0.7670         | B  | 2280   | A  | 0.030060 | A | 63.61  | A  |

\*Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.05$ ).

Apendice 6.

Cuadro 3. Síntesis de Medias prueba Tuckey ( $P \leq 0.05$ )

| Enzima     | Tratamiento       | Síntesis                                                                                                                                                                                 |
|------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FEN</b> | Semilla           | Pyraclostrobin, siempre se mantuvo abajo, los demás no significativos, pero siempre en aumento.                                                                                          |
|            | Semilla y follaje | Todos los tratamientos tienen un mismo contenido inicial, ligero descenso y luego tienden a subir, Boscalid+ Pyraclostrobin termina con mayor estímulo para fenoles.                     |
| <b>POX</b> | Semilla           | La actividad inicia más alta con Azoxystrobin, mas alta que el resto, rápido ascenso general y todos terminan con gran actividad, pero sin ser significativos.                           |
|            | Semilla y follaje | Inicia más alto Boscalid+ Pyraclostrobin, pero termina intermedio.                                                                                                                       |
| <b>PAL</b> | Semilla           | Fosetil-Al y testigo casi sin cambios terminando como los mas bajos, únicos con valores significativos Boscalid + Pyraclostrobin y Azoxystrobin que siempre fueron en aumento.           |
|            | Semilla y follaje | Todos con valores muy bajos y poco significativos, excepto Fosetil-Aluminio, con valores altos de la actividad.                                                                          |
| <b>SOD</b> | Semilla           | Fosetil-Al inicia al máximo, pero descenso continuo, termina intermedio, los demás descienden pero suben actividad al final, Boscalid+ Pyraclostrobin, obtuvieron la actividad mas alta. |
|            | Semilla y follaje | Datos no significativos para todos los tratamientos, excepto Fosetil-Al, que resulta ser superior al resto.                                                                              |

**Cuadro 4. Actividad enzimática de los tratamientos y de cada uno de los fungicidas.**

|     | TRAT              | Azoxystrobin                                                         | Boscalid +<br>PYR                              | Pyraclostrobin                                          | Fosetil-Al                                                                             | Testigo                                  |
|-----|-------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| FEN | semilla           | Con actividad ligera                                                 | intermedia                                     | Siempre abajo                                           | intermedia                                                                             | intermedia                               |
|     |                   |                                                                      |                                                | TODOS EN AUMENTO                                        |                                                                                        |                                          |
|     | Semilla y follaje | intermedia                                                           | Intermedia con aumento en actividad            | Intermedia y con baja en la actividad                   | Intermedia                                                                             | intermedia                               |
|     |                   |                                                                      |                                                | Actividad ligera al principio y aumento al final        |                                                                                        |                                          |
| POX | Semilla           | Máxima síntesis al inicio                                            | intermedio                                     | intermedio                                              | intermedio                                                                             | Bajo en el 2° muestreo                   |
|     |                   |                                                                      | Rapido ascenso, sin diferencias significativas |                                                         |                                                                                        |                                          |
|     | Semilla y follaje | Intermedio al comienzo, baja al final                                | Inicia máximo, termina intermedio              | Altibajos máximos, terminan intermedio                  | Siempre intermedio, termina maximo                                                     | intermedio                               |
| PAL | semilla           | Empieza y termina alto                                               | Empieza bajo, termina alto                     | Empieza alto, termina intermedio                        | Sin aumento, empieza alto, termina bajo                                                | intermedio                               |
|     | Semilla y follaje | TODOS MUY BAJOS SIEMPRE                                              |                                                |                                                         | Empieza bajo, sube rápido y se mantiene                                                |                                          |
| SOD | semilla           | Alto al principio, intermedio al final                               | Desciende pero termina mas alto                | Desciende y sube, pero siempre el de mas baja actividad | Empieza el mas alto, pero descende lineal                                              | Empieza el mas bajo y termina intermedio |
|     | Semilla y follaje | Imperceptibles en los primeros dos muestreos y siguen bajos después. |                                                | Imperceptible al principio, sube y queda intermedio.    | Parecidos al principio, el testigo se queda en el mismo nivel mientras Fosetil-Al sube |                                          |

**Cuadro 5. Resumen de correlaciones significativas entre todos los Tratamientos y Fungicidas.**

| FUNGICIDA      | SEMILLA Y FOLLAJE           | SOLO SEMILLA                                              |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Azoxystrobin   | INF/SOD                     | INF/FEN , FEN/POX<br>FEN/PAL, INF/POX<br>INF/PAL, POX/PAL |
| Boscalid + PYR | INF/SOD, FEN/SOD<br>POX/PAL | INF/FEN, FEN/POX<br>INF/POX, FEN/PAL<br>INF/PAL           |
| Pyraclostrobin | NINGUNA                     | INF/FEN FEN/POX POX/PAL<br>INF/POX FEN/PAL<br>INF/PAL     |
| Fosetil-Al     | INF/POX POX/SOD<br>INF/SOD  | INF/FEN FEN/POX<br>INF/POX                                |
| Testigo        | INF/PAL                     | INF/POX FEN/POX<br>INF/FEN<br>INF/PAL                     |

INF: infección, FEN: fenoles, POX: peroxidasa, SOD: superóxido, PAL: fenilalanina-amonioliasa.