



*“Enseñar la explotación de la tierra.”*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

---

---

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

**“ALGUNOS MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE DEFENSA EN PAPA  
(*Solanum tuberosum* L.) POR LA ACCIÓN DE FUNGICIDAS”**

**TESIS**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA**

**SERRANO CERVANTES ROCIO**



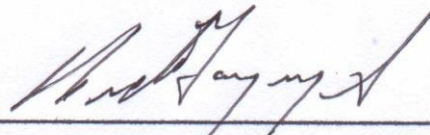
DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

**CHAPINGO, MÉXICO, MAYO 2014**

**“Algunos mecanismos enzimáticos de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) por la acción de fungicidas”**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Rocío Serrano Cervantes de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

**DIRECTOR**



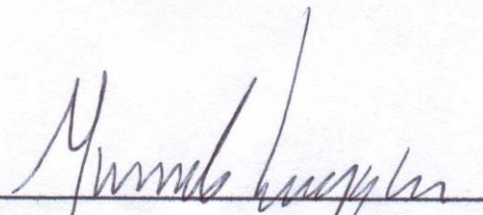
Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña

**ASESOR**



Dra. Maria Teresa Beryl Colinas

**ASESOR**



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....  | 6  |
| <b>DEDICATORIA</b> .....  | 7  |
| <b>DATOS BIBLIOGRÁFICOS</b> .....                                   | 8  |
| <b>RESUMEN</b> .....  | 9  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 10 |
| <b>1. INTRODUCCION</b> .....  | 11 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 13 |
| 2.1 Objetivo general.....   | 13 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                      | 13 |
| <b>3. HIPÓTESIS</b> .....   | 13 |
| <b>4. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....                              | 14 |
| 4.1 Fungicidas para Oomycetes.....                                  | 14 |
| 4.2 Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno..... | 14 |
| 4.2.1 Interacciones planta-patógeno.....                            | 18 |
| 4.2.2 Nutrición de patógenos.....                                   | 18 |
| 4.2.3 Especificidad de las interacciones planta-patógeno.....       | 18 |
| 4.2.4 Defensa de las plantas.....                                   | 20 |
| 4.2.5 Activación de la defensa.....                                 | 21 |
| 4.2.6 Reacción de hipersensibilidad.....                            | 22 |
| 4.3 Defensa metabólica inducida por el ataque de patógeno.....      | 23 |
| 4.3.1 Defensa por medio de compuestos fenólicos.....                | 23 |
| 4.3.2 Fitoalexinas.....   | 23 |
| 4.3.3 Superóxido Dismutasa (1.15.1.1.SOD).....                      | 25 |
| 4.3.4 Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX).....                            | 26 |
| 4.3.5 Catalasa.....   | 27 |
| <b>5. MATERIALES Y METODOS</b> .....                                | 28 |
| 5.1 Localización del experimento y tratamientos.....                | 28 |
| 5.2 Invernadero.....  | 28 |
| 5.3 Laboratorio.....  | 29 |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.3.1 Determinación de fenoles.....                       | 29        |
| 5.3.2 Superóxido dismutasa (1.15.1.1.SOD).....            | 29        |
| 5.3.3 Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX).....                  | 30        |
| 5.3.4 Catalasa.....                                       | 30        |
| 5.3.5 Análisis de resultados.....                         | 30        |
| <b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                     | <b>31</b> |
| 6.1 Fenoles Totales.....                                  | 31        |
| 6.2 Actividad de Superóxido dismutasa (1.15.1.1.SOD)..... | 34        |
| 6.3 Actividad de Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX).....       | 38        |
| 6.4 Actividad de catalasa.....                            | 42        |
| 6.5 Análisis de Correlación.....                          | 45        |
| <b>7. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>                          | <b>50</b> |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>                               | <b>52</b> |
| <b>9. LITERATURA CITADA.....</b>                          | <b>53</b> |
| <b>10. APÉNDICES.....</b>                                 | <b>60</b> |
| Apéndice 1.....   | 60        |
| Apéndice 2.....   | 62        |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Actividad de fenoles totales a dosis completa.....  | 31 |
| <b>Figura 2.</b> Actividad de fenoles totales a dosis media.....   | 33 |
| <b>Figura 3.</b> Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) a dosis completa.....                            | 35 |
| <b>Figura 4.</b> Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) a dosis media.....                               | 36 |
| <b>Figura 5.</b> Actividad enzimática de peroxidasa (POX) a dosis completa.....                                      | 39 |
| <b>Figura 6.</b> Actividad enzimática de peroxidasa (POX) a dosis media.....   | 40 |
| <b>Figura 7.</b> Actividad enzimática de catalasa (CAT) a dosis completa.....  | 42 |
| <b>Figura 8.</b> Actividad enzimática de catalasa (CAT) a dosis media.....   | 44 |
| <br>   |    |
| <b>Cuadro 1.</b> Fungicidas utilizados para control de Oomycetes.....  | 15 |
| <b>Cuadro 2.</b> Moléculas activadoras o agentes bióticos y abióticos reportados como inductores de resistencia..... | 17 |
| <b>Cuadro 3.</b> Tratamientos aplicados a la variedad Agata de papa.....   | 28 |
| <b>Cuadro 4.</b> Correlación entre variables para el fungicida Metalaxil-m (Ridomil Gold®).....                      | 46 |
| <b>Cuadro 5.</b> Correlación entre variables para el fungicida Fosetil-AI (Aliette®).....                            | 46 |
| <b>Cuadro 6.</b> Correlación entre variables para el fungicida Mandipropamida (Revus®).....                          | 47 |
| <b>Cuadro 7.</b> Correlación entre variables para el fungicida Fluoxastrobin (Vigold®).....                          | 48 |
| <b>Cuadro 8.</b> Correlación entre variables para el tratamiento testigo.....  | 48 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría (Generación 50).

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme superarme.

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

Al comité asesor por su asesoría en el desarrollo del presente trabajo. Por sus enseñanzas, aportaciones, dedicación y confianza Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña, Dra. María Teresa Colinas Beryl León y Dr. Gerardo Leyva Mir.

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

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico con mucho amor y cariño...

A Dios por prestarme vida para seguir superándome en esta vida que es tan corta, por no desampararme en los momentos de desesperación y tristeza. Por darme fuerza y voluntad de seguir adelante y por mi familia que siempre me ha apoyado.

A mis padres porque siempre confiaron en que podía terminar este proyecto. Porque gracias a su dedicación y sacrificio hoy puedo terminar lo que un día empecé, por apoyarme, no solo económicamente, sino por sus palabras de aliento y sus muestras de cariño cuando las necesité.

A mis hermanos Rubén, Rogelio, Esme y Lizet, sin duda mi trayecto sin ustedes hubiera sido aburrido y triste, porque ustedes siempre estuvieron para darme ánimos y hacerme reír cuando me desesperaba.

A los doctores que fueron parte de mi comité, por su tiempo, su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación en la maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo y en especial al Departamento de Parasitología Agrícola que me dieron la oportunidad de formar parte de su posgrado.

## **DATOS BIBLIOGRÁFICOS**

La autora de esta tesis nació en Los Reyes de Salgado, Michoacán (Mayo de 1989). Realizó sus estudios a nivel superior en la Universidad Autónoma Chapingo, en la carrera agronómica de fitotecnia, egresó en el año 2011 obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia.

Durante los estudios a nivel superior adquirió conocimientos sobre temas relacionados a control biológico de plagas y enfermedades en cultivos de frutillas, caña de azúcar y aguacate. Durante los estudios de posgrado obtuvo conocimientos sobre materiales y reactivos de laboratorio.



## RESUMEN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los que más agroquímicos utiliza entre las especies comestibles cultivadas. No obstante, el control químico de sus plagas y enfermedades es la estrategia más práctica de su manejo fitosanitario. Existen evidencias documentadas sobre la acción de algunos fungicidas directamente sobre la planta, pero siempre en presencia del patógeno, sin especificar si el hospedante responde al patógeno, al producto o a ambos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar algunas reacciones de defensa de las plantas estimuladas por fungicidas en ausencia de patógenos. Bajo invernadero, se hicieron aspersiones foliares semanales de fungicidas (dosis medias y completas) a plantas de la variedad Agata (susceptible a oomicetos), colectando follaje con la misma frecuencia y analizándolo para la presencia y acción de varias enzimas relacionadas con reacciones de defensa no específica. La cantidad de fenoles totales (FEN) fue muy parecida entre tratamientos, excepto por la dosis completa de fluoxastrobin, que estimuló su síntesis por encima de los demás fungicidas al final del ciclo. La acción de la superóxido-dismutasa (SOD), por el contrario, se estimuló más durante la primera mitad del ciclo de crecimiento, sobresaliendo el testigo. Posteriormente se uniformó su actividad, excepto nuevamente por fluoxastrobin, en media dosis, que mantuvo a la SOD por encima del resto de los productos. Todos los tratamientos estimularon uniformemente la actividad de la peroxidasa (POX) por encima del testigo (agua) al final del ciclo. La actividad de la catalasa (CAT) disminuyó continuamente a lo largo del ciclo en las plantas testigo, mientras que los tratamientos estimularon su actividad mayormente a la mitad del ciclo sin estímulo específico sobresaliente por algún fungicida en particular. Se indujeron actividades parecidas de determinadas enzimas por los diferentes productos, que se reflejan en las altas interacciones significativas entre POX y CAT, POX y SOD, SOD y CAT, y de FEN con SOD y POX, evidenciándose la no especificidad de reacción de la planta ante los principios activos de los fungicidas incluidos en el presente estudio.

Palabras clave: *Solanum*, enzimas de defensa, FEN, SOD, POX, catalasa

## ABSTRACT

The potato crop (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most pesticide-consuming crops among the eatable species grown. Nevertheless, pests and diseases chemical control is the most practical approach as health management strategy. Documented evidences exist on direct action of some fungicides over the plant, but always in the presence of the pathogen, with no clarification on the host reaction to the pathogen, the product or both. The objective of this study was to evaluate some plant defense reactions stimulated by the fungicides in the absence of pathogens. Under greenhouse conditions, weekly foliage fungicide sprays were made (half and complete dosages) to potato plants cv. Agata (oomycetes susceptible), sampling foliage with the same frequency followed by analyzing presence-action of several enzymes related to non-specific defense reactions. Total amount of phenols (FEN) was pretty close among treatments, except for the complete dosage of fluoxastrobin, which stimulated phenol synthesis over the other fungicides at the end of the growing cycle. On the other hand, Superoxide dismutase (SOD) activity was more stimulated along the first half of the growing cycle in the controls, and its action was more uniform among treatments later on, except again for the half dosage of fluoxastrobin, which kept SOD activity higher than the rest of the products. All the treatments uniformly stimulated peroxidase (POX) activity over the control (water) at the end of the cycle. Catalase (CAT) activity continuously decreased along the growing cycle in the control plants, while the treatments stimulated its activity mainly at midseason, with no specific outstanding stimuli by any particular fungicide. Similar activities among specific enzymes were induced by different products, reflected in the highly significant interactions between POX and CAT, POX and SOD, SOD and CAT, and FEN with SOD and POX, which is an evidence of the lack of the plant specific reactions to the quite different active ingredients of the fungicides included in this study.

Keywords: *Solanum*, defense enzymes, FEN, SOD, POX, catalase

## 1. INTRODUCCION

A nivel mundial el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa el quinto lugar en importancia, después de arroz, trigo, maíz y frijol; como cultivo en México, la papa ocupa el lugar 35 por la superficie sembrada que es de 69,054.26 ha, obteniendo una producción de 1, 433,239.14 ton.(SIACON, 2011). El cultivo de papa es de los pocos que se desarrolla en casi todo el territorio nacional. Actualmente se cultiva en veintitrés estados de la República, pero sólo seis aportan el 66% de la producción total, aproximadamente. Se cultiva en los ciclos Otoño-Invierno y Primavera-Verano; tanto en la modalidad de riego como en la de temporal. A pesar que la papa se produce casi todo el año y de su gran valor alimenticio, el consumo per cápita en nuestro país es muy bajo, en 2007 apenas alcanzó 17.2 kgs./hab/año, mientras que en países como Polonia, Ucrania y Portugal el consumo es de 136, 135 y 128 kgs./hab/año, respectivamente; en Estados Unidos el consumo es de aproximadamente 60 kilos por habitante (SIAP, 2012). En este cultivo, como en cualquier otro, influyen factores tanto bióticos como abióticos en la producción lo cual puede beneficiar o mermar la misma. Un factor biótico importante en la producción de papa es el tizón tardío, enfermedad que se manifiesta en defoliaciones de la planta y pudriciones de frutos y tubérculos en el campo y almacén. Es causada por el oomiceto *Phytophthora infestans* Mont de Bary, y ha sido el principal problema fitosanitario de este cultivo por más de siglo y medio. La enfermedad puede destruir el follaje y los tallos de la papa en cualquier momento durante la estación de crecimiento de las planta. Puede atacar también a tubérculos de papa y a los frutos del tomate en el campo. El tizón tardío puede destruir totalmente todas las plantas de una zona de cultivo al cabo de una o dos semanas cuando las condiciones climáticas son favorables y cuando no se aplica ningún método de control. No obstante, las pérdidas varían de un área a otra y de un año en año, dependiendo de la temperatura y humedad predominantes en ciertos periodos de la estación de crecimiento de las plantas y de los métodos de control empleados. Aun cuando las pérdidas en el campo sean insignificantes, las papas pueden ser infectadas durante una cosecha y pueden pudrirse cuando son almacenadas (Agrios, 2007).

El control de las enfermedades se realiza principalmente mediante métodos químicos, lo cual tiene un costo tanto económico como ambiental (Arauz, 1998).

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa. De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados, la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. Se propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta, los genes que determinan la resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning, 1980).

La combinación de las características estructurales y reacciones bioquímicas que utilizan las plantas para defenderse de los patógenos difieren en las distintas interacciones hospedante-patógeno. Además, incluso al tratarse del mismo hospedante y patógeno, las combinaciones varían con la edad de la planta, el tipo de órganos y tejidos de ésta al ser atacados y el estado nutricional de la planta, así como las condiciones climáticas (Agrios, 2007).

La introducción de fertilizantes y plaguicidas durante los años 60 y 70, como parte de la revolución verde, fue poderosa y esperanzadora en esa época, porque lograba controlar exitosamente las plagas que afectaban los cultivos. Pero el desarrollo de resistencia a los plaguicidas, por parte de muchas plagas, pusieron en tela de juicio esos programas, además provocaron serios problemas en la salud humana y animal y daños irreparables en el suelo y el ambiente. Esto ha llevado a revisar detenidamente las prácticas agrícolas y a buscar una agricultura menos contaminante, como la producción orgánica. En este tipo de producción, el empleo de sustancias obtenidas a partir de microorganismos o de plantas constituye una alternativa de protección más eficaz que los agroquímicos, desde el punto de vista ambiental y de la salud de los productores y consumidores. Recientemente, la atención se ha enfocado

también al potencial para inducir en los cultivos resistencia a las plagas (Riveros, 2001).

Por otro lado, existe evidencia de la inducción de resistencia a enfermedades debido a la aplicación de productos dirigidos o no al patógeno (Deckers y Creasy, 1989; Kessmann *et al.*, 1994; Robledo *et al.*, 2012; White, 1979; Gottsein y Kuúc, 1989; Kessmann *et. al* 1994), aunque esa resistencia no queda clara si es producto o consecuencia exclusivamente por la presencia del producto o por la interacción producto-patógeno, por lo que en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar algunas reacciones de defensa de la papa, en ausencia del patógeno, por exposición a agroquímicos.

### **2.2 Objetivo particular**

Quantificar la actividad enzimática de papa en ausencia de patógenos, bajo invernadero, correlacionando dicha actividad con la respuesta a dosis de fungicidas y a fases de crecimiento de la planta.

## **3. HIPOTESIS**

La actividad enzimática es mayor cuando se aplican productos químicos a la planta que cuando no se aplican. Por lo tanto, la actividad enzimática incluida en el presente estudio en el testigo es menor a todos los fungicidas utilizados ya mayor dosis la actividad enzimática es mayor en las plantas tratadas.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Fungicidas para Oomycetes

Considerando que el tizón tardío de la papa es el patógeno más importante en la papa, el presente estudio se enfocó a productos que lo combaten. Existen varios tipos de fungicidas desarrollados específicamente para oomycetes. El mayor grupo lo constituyen las fenilamidas, las cuales son altamente eficaces e incluyen, entre otros, al metalaxyl, benalaxyl y oxadixil. Estos fungicidas se formulan tanto para uso en follaje como para la aplicación en suelo (Arauz, 1998). Además, existen otros que se utilizan para el control de tizón tardío de la papa (Cuadro 1).

### 4.2 Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno

La inducción de resistencia (IR) a patógenos fue considerada por primera vez con los estudios de inmunización realizados por Ray y Beauverie (1901); mientras que los primeros trabajos de inducción de resistencia a insectos plaga se realizaron 70 años después, a éstos se sumaron otros investigadores que hacían referencia al fenómeno (Beauverie 1901, Chester 1933, Green y Ryan 1972, Haukioja y Hakala 1975, Kuùc *et al.* 1959, Loebenstein 1963, Ray 1901, Ross 1966). En los años 70 y 80 se publicaron otros trabajos, (Carter *et al.* 1978, Doubrava *et al.* 1988, Kuùc 1982, Kuùc 1987). En 1993, se demostró cómo funcionaban las moléculas activadoras, tanto en condiciones de invernadero como en campo, con enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus (Kuùc, 1993).

Estos trabajos despertaron el interés de compañías transnacionales privadas, las cuales iniciaron investigaciones con el propósito de obtener y evaluar moléculas activadoras abióticas sintéticas, que catalogaron como excelentes candidatas para la inducción de resistencia.

Desde entonces, el camino se ha ido abriendo lentamente y a inicios de este siglo, algunas de ellas han sido incorporadas en programas de agricultura y horticultura a escala comercial (Kuùc, 2001).

Cuadro 1. Fungicidas para control de Oomycetes (Arauz, 1998).

| Nombre comercial      | Ingredientes activos | Observaciones  |
|-----------------------|----------------------|--|
| Revus 250 SC          | Mandipropamida       | Pertenece al grupo de las Mandelamidas, inhibe la germinación de zoosporas y esporangios, desarrollo micelial y esporulación del hongo. Se aplica cuando la planta se encuentra en etapa de floración.   |
| Ridomil Gold Mz WG    | Mefenoxam + Mancozeb | Pertenece al grupo de las fenilamidas, es una mezcla de fungicidas con distinto modo de acción, Mefenoxam actúa en forma sistémica donde se trasloca por el sistema vascular a otros tejidos y Mancozeb es de contacto que permanece sobre el follaje, impidiendo que las esporas germinen y penetren causando nuevas infecciones. Se recomienda aplicar en semillero, al momento de trasplante y en etapa de crecimiento. |
| Previcur <sub>N</sub> | Propamocarb          | Pertenece al grupo de los carbamatos, es un fungicida sistémico bioestimulante, es de acción preventiva y curativa para combatir hongos del suelo y follaje del grupo de los oomicetos. Se puede utilizar en el tratamiento de semilla, en material de trasplante o en aplicaciones foliares.  |
| Aliette 800 WG        | Fosetil Al           | Pertenece al grupo químico alcoifosfonatos. Es un fungicida de doble sistemia con acción sobre enfermedades producidas por hongos oomicetos y deuteromicetos.  |
| Comet                 | Pyraclostrobin       | Pertenece al grupo de las estrobirulinas, especialmente indicado para el control de tizones. Es un fungicida que actúa por inhibición de la germinación de las esporas, el desarrollo del tubo germinativo y la esporulación.  |
| Amistar               | Azoxistrobin         | Pertenece al grupo de las pirimidinas. Se aplica al follaje en cultivo de papa contra <i>Alternaria solani</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Helminthosporium solani</i> .  |
| Vigold                | Fluxastrobin         | Se utiliza para aplicación foliar y para tratamiento de semillas.  |

En la actualidad, se han completado estudios de inducción de resistencia en 30 especies de plantas aproximadamente y, paradójicamente, el mayor desarrollo se ha experimentado en insectos, donde se han estudiado 100 especies, esto incluye resistencia inducida por patógenos, insectos plaga o sus productos y diversos grupos de moléculas activadoras orgánicas e inorgánicas (Karban y Kuùc, 2000).

Las moléculas activadoras no deben ser tomadas como sustitutos de fungicidas, sino como una alternativa adicional dentro de una estrategia de manejo integrado (Lyon y Newton, 2000).

En una relación planta-patógeno, es conveniente hacer la distinción entre moléculas activadoras de origen vegetal, llamadas activadoras endógenas y las de origen parasitario o producidas por algún agente físico externo, conocidas como activadoras exógenas. En el caso de las primeras, se sabe que las células vegetales poseen una pared celular, la cual presenta un 90% de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) asociados a un 10% de proteínas y esta pared celular puede liberar moléculas activadoras endógenas, responsables de la inducción de mecanismos de defensa en ellas. Mientras que las moléculas activadoras exógenas pueden ser clasificadas en bióticas y abióticas (Cuadro 2) (Riveros, 2001).

Una nueva alternativa de control de enfermedades de plantas se basa en la “resistencia inducida”, mediante la cual las plantas son protegidas de las enfermedades causadas por hongos, ya sea a través de una infección inicial por un patógeno (Kuùc, 1982) o por la aplicación de productos químicos sintéticos que activan respuestas de resistencia de la planta (White, 1979; Gottsein y Kuùc, 1989; Kessmann *et. al* 1994).



Cuadro 2. Moléculas activadoras o agentes bióticos y abióticos reportados como inductores de resistencia (Riveros, 2001).

| <b><u>Origen biótico</u></b>   | <b><u>Origen abiótico</u></b>   |
|--|---|
| Hongos, bacterias, virus, nematodos, insectos (asperjados, inyectados o puestos en contacto)                                 | Fosfatos de potasio o de sodio  |
| Fragmentados de pared celular desde bacterias  | Especies de oxígeno (los AOS): ácido per-acético (ácido acético + peróxido de hidrógeno) y EDTA   |
| Fracciones de pared celular desde hongos   | Cloruro férrico, Aliette (fosetil-Al)   |
| Fragmentos de pared celular de células vegetales   | Silica, glicina, ácido glutámico, ácido $\alpha$ y $\beta$ -aminobutírico, ácido $\beta$ -aminoisobutírico<br>D-fenilalanina, D-alanina, dodecyl-DL-alanina, dodecyl DL-valina, DL-triptófano y riboflavina |
| Fluido intercelular extraído de plantas infectadas   | Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico<br>Ácido salicílico, metil éster del ácido jasmónico, etileno  |
| Extractos de origen vegetal  | Ácido isovanílico, ácido vanílico, ácido siringico, ácido protocateiquico<br>Floroglucinol, ácido galico, ácido 1,3,5 benzeno tricarbóxico, ácido poliacrílico  |
| Preparaciones de cultivos en crecimiento de bacterias, levaduras e insectos  | Ácido D-galacturónico, ácido D-glucurónico, glicolato, ácido oxálico<br>Ácido oleico, ácido linoleico, ácido arácidonico, ácido eicosapentaenoico   |
| Fluido de esporas en germinación de hongos   | Paraquat, acifluorfen, clorato de sodio, óxido nítrico<br>Ácido 2,6-dicloroisonicotínico  |
| Preparaciones a partir de aparatos bucales y secreciones de insectos (volicitin)   | Benzo(1,2,3)thiadiazolel-7-carbothioic acid <i>s</i> -methyl ester Probenazole, Ácido 2,2 dicloro-3,3 di-metil ciclopropano carboxílico   |
| Fracciones de glucano, quitina, pectina o quitosano degradados desde la pared de microorganismos por tratamiento con enzimas | Penantrolina y sales de metales complejos como: cobalto, hierro y cobre<br>Laminarina, quitosano, quitina, quitina coloidal y glucanos sintéticos   |
| Exudados de rizobacterias promotoras de crecimiento  | Messenger™, Detergentes   |

#### **4.2.1 Interacciones planta-patógeno**

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden mostrar varios tipos que van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecies. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies, aislamientos o razas de patógenos (Heath, 2000a).

#### **4.2.2 Nutrición de los patógenos**

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrientes de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos de hospedantes vivos son llamados *biotrofos*. Estos patógenos, también conocidos como parásitos obligados, necesitan mantener la célula hospedante viva y emplean para ello mecanismos de invasión sumamente sutiles. Los apresorios son estructuras de penetración usadas por algunos hongos para evitar el daño excesivo del tejido durante las fases iniciales de la patogénesis. Entre los patógenos biotróficos se encuentran los virus, los nematodos y algunos hongos especializados, tales como las royas. Otro tipo de patógenos, denominados *necrotróficos*, producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrientes a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas. Estos muchas veces utilizan diferentes toxinas capaces de degradar el tejido de la planta y facilitar la invasión (Collinge *et al.*, 2001).

#### **4.2.3 Especificidad de las interacciones planta-patógeno**

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. Esta especificidad es más fácil de estudiar a nivel de cultivar, es decir, especies cultivadas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético para producir poblaciones

de plantas altamente homogéneas en su contenido genético. Como resultado de este proceso, nuevas razas de patógenos, específicas para cada cultivar, aparecen debido a la presión de selección. Una interacción biotrófica se caracteriza por tener un alto grado de especificidad ya que el patógeno necesita mantener las células hospedantes vivas, evitando la inducción de defensa, para poder sobrevivir. Se cree que esta especificidad es el resultado de una evolución entre ambos organismos. En general, estas relaciones están determinadas a nivel de razas del patógeno y cultivares del hospedante. La especificidad observada sirve para seleccionar la interacción que proporcione una ventaja para una de las partes (patogénesis o resistencia), o para ambos organismos (simbiosis) (De Wit, 1997).

Un patógeno puede ser muy patogénico o poco patogénico para un hospedante dado. El grado de patogenicidad se define frecuentemente como *virulencia* (Collinge *et al.* 2001). De esta forma, y dependiendo de su habilidad de causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro. Estos conceptos han sido discutidos por Van der Plank (1968) quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del hospedante. En otras palabras, la virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta. Por otro lado, la resistencia vertical (monogénica u oligogénica) y la resistencia horizontal (poligénica) son los extremos de todo un espectro de niveles de resistencia. Sin embargo, en términos genéticos, virulencia se utiliza para definir si una variante o raza de un patógeno puede o no causar enfermedad en una variedad o cultivar del hospedante. En otras palabras, una raza de un patógeno es virulenta si produce enfermedad y avirulenta si no produce enfermedad a un cultivar determinado del hospedante. En las interacciones planta patógeno a nivel de especie, la resistencia del hospedante se conoce como resistencia no-hospedante, mientras que a nivel de raza-cultivar se denomina resistencia determinada por la raza. En este último caso, una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran *resistencia* y otros que muestran *susceptibilidad* a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un cultivar determinado (Collinge *et al.* 1994).

Por lo tanto, para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tomar en cuenta los dos componentes de sistema. En otras palabras, se debe estudiar la virulencia o avirulencia de un patógeno siempre en relación con la resistencia o susceptibilidad del hospedante. Para dar la importancia adecuada a la interrelación entre los dos organismos es conveniente utilizar los términos *interacción compatible* e *interacción incompatible*. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando el hospedante es resistente y el patógeno es avirulento. Las interacciones incompatibles (hospedante resistente, patógeno avirulento) se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa que frecuentemente están asociados a la manifestación de la reacción hipersensible (Heath, 2000b). Por el contrario, en las interacciones compatibles (hospedante susceptible, patógeno virulento), el reconocimiento no se lleva a cabo, la respuesta de defensa no es activada y la enfermedad se establece (De Wit, 1997).

#### **4.2.4 Defensa de las plantas**

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer *mecanismos constitutivos* de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa *estructurales constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa *químicos constitutivos*, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Algunos ejemplos de este tipo son las plantas cianogénicas como el sorgo (*Sorghum* sp.) y la yuca (*Manihot esculenta*) que poseen cantidades considerables de compuestos relacionados con el ácido cianhídrico (HCN) (Osbourn, 1996). De esta forma, los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucran una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno. A diferencia de la defensa constitutiva, los

mecanismos inducidos de defensa, también llamados como *resistencia inducida*, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*, 1994). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998).

#### **4.2.5 Activación de la defensa**

La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno. Ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas son capaces de actuar como *inductores* de defensa. Los *inductores no-específicos* son cualquier sustancia que induce la activación de defensa de forma no específica. Por ejemplo, los polímeros de azúcar que conforman la pared celular tanto de hongos como de las células vegetales, son reconocidos desde hace varios años como agentes capaces de inducir la expresión de genes de defensa en plantas (Darvill y Albersheim, 1984). Esto es congruente con el hecho de que la muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad, libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes. De manera similar, la actividad de algunas enzimas hidrolíticas, producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, liberan componentes de la pared celular de ciertos hongos que tienen un efecto inductor de defensa en los tejidos vegetales. La reacción de defensa también se puede activar de forma no específica por factores abióticos como el choque térmico, la sequía, diversas sustancias químicas y la luz ultravioleta. En general, este tipo de inductores abióticos activan respuestas de defensa ya que provocan heridas y daño físico en los tejidos (Collinge *et al.* 2001).

En general, las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, las cuales

producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. La combinación de las características estructurales y reacciones bioquímicas que utilizan las plantas para defenderse de los patógenos difieren en las distintas interacciones hospedante-patógeno. Además, incluso al tratarse del mismo hospedante y patógeno, las combinaciones varían con la edad de la planta, el tipo de órganos y tejidos de ésta al ser atacados y el estado nutricional de la planta así como las condiciones climáticas (Agrios, 2007).

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".

#### **4.2.6 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 sobreviven 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 (Agrios, 2007).

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 (Jiménez *et al.*, 1997)

### **4.3 Defensa metabólica inducida por el ataque de los patógenos**

#### **4.3.1 Defensa por medio de compuestos fenólicos**

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, *et al.*, 1995).

Sin embargo, algunos otros fenoles no los producen las plantas sanas, excepto cuando son estimuladas por algún patógeno o por el daño ocasionado por un agente químico o mecánico, a estos compuestos se les conoce como fitoalexinas (Agrios, 2007).

#### **4.3.2 Fitoalexinas**

Las fitoalexinas se producen por las células sanas adyacentes a las células necróticas y dañadas, en respuesta a sustancias que difunden a partir de las células dañadas. La resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno. La mayoría de las fitoalexinas conocidas son tóxicas a los hongos fitopatógenos cuyo desarrollo inhiben, pero algunas también son tóxicas a bacterias, nematodos y otros organismos patógenos. Algunas de las fitoalexinas mejor estudiadas incluyen a la phaseolina y a la cievitona en el frijol, la pisatina en el chícharo, la gliceolina en la soya, alfalfa y trébol, la rishitina en la papa, el gosispol en el algodón y el capsidiol en el chile. 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 (Agrios, 2007). 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 Deckers 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 rizoctonias obteniendo resultados positivos.

Los primeros reportes sobre la presencia de estos metabolitos fueron descritos por Muller y Borger (Kuc, 1995) mostraron fuertes evidencias de la resistencia de las plantas a enfermedades al observar la resistencia de la papa al oomiceto *Phytophthora infestans* causada por la producción de compuestos fungitóxicos por la planta hospedera. Algunos investigadores sugieren que las fitoalexinas son metabolitos, producto del estrés, inducidos por altos niveles de radiación ultravioleta, heridas, descenso de temperatura y por la aplicación de fungicidas (García *et al.*, 2003).

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).

Los elicitores de fitoalexinas se producen más frecuentemente como consecuencia de la infección causada por hongos, aunque también se han descrito elicitores producidos durante la infección por bacterias (*Pseudomonas corrugata*), las cuales inducían la producción de medicarpina en trébol blanco (*Trifolium repens*) (Gustine *et al.*, 1991).

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

#### **4.3.3 Superóxido dismutasa (1.15.1.1. 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, falta de oxígeno y ataque por patógenos se han correlacionado con la actividad SOD (Monk *et al.*, 1989).

En estudios realizados por Wang *et al.*, donde utilizan la raíz de *Arctium lappa*, perteneciente a la familia *Asteraceae* y tiene propiedades medicinales, para tratar semillas de pepino con el fin de protegerlas del ataque del hongo fitopatógeno *Colletotrichum orbiculare*. La investigación reporta que el pretratamiento de las semillas reduce lesiones causadas por el patógeno, provocando la inducción de la resistencia sistémica adquirida con una amplia producción endógena del Ácido salicílico, así también se encontró una gran cantidad de lignina a nivel de pared celular así como la inducción de algunas enzimas claves en la defensa (peroxidasa, superóxido dismutasa, polifenoloxidasas y beta-1,3-glucanasa).

#### 4.3.4 Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX)

La importancia de la actividad de la polifenoloxidasas en la resistencia a las enfermedades probablemente se debe a su propiedad de oxidar los compuestos fenólicos hasta quinonas, las cuales con frecuencia son mucho más tóxicas a los microorganismos que los fenoles originales. Es razonable suponer que una mayor actividad de las polifenoloxidasas ocasionaría concentraciones mayores de productos tóxicos resultantes de la oxidación y, por lo tanto, un mayor grado de resistencia a la infección. Otra enzima oxidasa, la **peroxidasa (POX)**, no sólo oxida a los compuestos fenólicos, sino también aumenta la velocidad de polimerización de esos compuestos en sustancias similares a la lignina, que se depositan en las paredes y papilas celulares e interfieren con el posterior crecimiento y desarrollo del patógeno. Las peroxidadas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidadas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia no relacionada estructuralmente con la anterior constituida por las peroxidadas animales (Welinder, 1992; Hiraga *et al.*, 2001). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidadas vegetales, fúngicas y bacterianas se han definido tres clases en base a las diferencias estructurales que existen entre ellas (Martínez, 2013):

- Clase I: está compuesta por la citocromo con peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores y las peroxidadas 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 peroxidadas 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 peroxidadas fúngicas de secreción (manganeso peroxidadas) (Eisenstadt y Bogolitsyn, 2010).

- Clase III: contiene todas las peroxidadas vegetales de secreción y muestran características distintas a otras peroxidadas vegetales. Son de naturaleza glicoproteica, están localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares.

Estas peroxidadas 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).

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, 1992).

#### **4.3.5 Catalasa**

Las especies de oxígeno reactivas como el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se forman durante la reducción del dióxígeno en agua. Estas especies pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes, entre los que se incluyen ciertas enzimas. El peróxido de hidrógeno se forma por la dismutación del radical superóxido y también en la reacción de algunas oxidasas. Hay varias enzimas capaces de degradar el peróxido de hidrógeno: las catalasas, las peroxidasas y las peroxirredoxinas (Maté *et. al.* 1999 y Lledías *et. al.* 1998).

A diferencia de las otras enzimas, que requieren de un sustrato reducido, las catalasas dismutan el peróxido de hidrógeno. Se han identificado tres grupos de catalasas: i) las catalasas monofuncionales, que contienen hemo y están presentes tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, ii) las Mn-catalasas, que son enzimas hexaméricas que no tienen hemo, tienen Mn en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos procariotas anaerobios y iii) las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa, contienen hemo y sólo están presentes en las bacterias y los hongos (Murshudovet *al.* 2002).

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Localización del experimento y tratamientos

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, en dos fases:

### 5.2 Invernadero

Bajo invernadero se estableció el cultivar de papa Agata en bolsas de plástico, bajo un diseño experimental completamente al azar (DECA). El experimento constó de aplicaciones semanales al follaje de dos dosis de cuatro fungicidas (ocho tratamientos) más el testigo sin aspersión de productos, sumando en total nueve tratamientos (Cuadro 3).

La aplicación de los productos se inició una vez que las plantas estuvieron en la etapa de desarrollo de hoja que inicia aproximadamente a 30 días después de la emergencia (figura 1, apéndice 1), el último muestreo se realizó cuando la planta estuvo en etapa de tuberización, algo importante de aclarar es que cada semana primero se tomaron las muestras (30 gr de hoja de la parte media de la planta) y posteriormente se aplicaron los productos, por esto la respuesta de la planta se obtuvo una semana después de cada aspersión.

Cuadro 3. Productos y dosis aplicados semanalmente al follaje.

| <b>Producto</b>            | <b>Dosis completa/10 litros de agua</b> | <b>Dosis media/ 10 litros de agua</b> |
|----------------------------|---|---------------------------------------|
| Ridomil® (metalaxil-m)     | 100 ml                                  | 50 ml                                 |
| Aliette® (fosetil-Al)      | 25 gr                                   | 12.5 gr                               |
| Revus®<br>(mandipropamida) | 10 ml                                   | 5 ml                                  |
| Vigold® (fluoxastrobin)    | 50 ml                                   | 25 ml                                 |
| Testigo: agua              | -----                                   | -----                                 |

Conforme el cultivo fue creciendo se tomaron muestras semanales de hojas de la parte media de la planta las cuales se llevaron al laboratorio de usos múltiples del departamento de Fitotecnia, donde se utilizaron para extraer polvo de acetona el cual sirvió para realizar el análisis de las diferentes enzimas catalogadas como de defensa, así se pudo observar su comportamiento, se utilizó acetona como reactivo

### **5.3 Laboratorio**

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

#### **5.3.1 Determinación de fenoles**

Se usan 0.025 ml del sobrenadante + 7.975 ml de agua desionizada + 0.5 ml de Folin- Ciocalteu + 1.5 ml de carbonato de sodio 20%. Se agita y deja reposar 2 h en la oscuridad para posteriormente leer la absorbancia a 760nm en un espectrofotómetro Genesys 10 uv Scanning (Thermo Scientific). La cuantificación se realiza mediante una curva patrón de ácido tánico y la concentración de fenoles totales se registra como mg g<sup>-1</sup>p.f. (Cornide *et al.*, 1994, Alia-Tejacal *et al.*, 2002, Martínez-Tellez y Lafuente, 1997; Lozoya *et al.*, 2006). Por las unidades en las cuales se registran los fenoles totales se refiere a la concentración en un gramo de peso fresco de la planta.

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

El método utilizado es el descrito por Beyer y Fridovich (1978). A partir de 0.05 gr de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se agregan 5ml de solución buffer fosfato 0.01 M pH 7.8 la cual debe estar en todo momento fría, se homogeniza inmediatamente, luego los tubos se colocan en hielo al homogeneizar, se decantan en tubos para centrifuga y se centrifugan a 16,000 rpm por 20 minutos a 4° centígrados, finalmente se sacan las muestras y se colocan a temperatura ambiente. En ausencia de luz se toman 3ml de solución

buffer EDTA-metionina, NBT y triton, se colocan en tubo de ensayo de rosca. Se agregan 0.5 ml de sobrenadante, se agita, se adiciona rivoftavina, se vuelve a agitar, se ilumina por 7 minutos con lámpara de luz fluorescente y se lee en el espectrofotómetro a 560 nm luz visible intensidad media. Se reporta como  $U\ g^{-1}p. f.$  indicando la actividad enzimática.

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

La actividad de POX se determinó mediante la metodología descrita por Alia-Tejagal *et al.*, (2002). La enzima se extrajo a partir de 0.05 g de polvo de acetona con 5ml de Tris-HCl frío (pH 7.1) conteniendo 1% de polivinilpirrolidona. Se mezcló en un homogeneizador de tejidos durante 50 segundos, posteriormente la mezcla se centrifugó por 20 min a 16,000 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 se realiza 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 evalúa el cambio de absorbancia a los 30, 60, 120 y 180 segundos a 470 nm. La actividad enzimática se reporta como  $U\ g^{-1}p. f.$  donde U= Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1  $mmol\ min^{-1}$  de tetraguayacol.

### **5.3.4 Catalasa**

La actividad enzimática se determinó por la metodología descrita por Alia -Tejagal *et al.*, (2002), la cual ya se explicó en el punto anterior, la actividad se reporta como  $U\ g^{-1}p. f.$

### **5.3.5 Análisis de resultados**

El análisis de los resultados obtenidos se hizo mediante los programas SAS (Statistical Analysis System) y Excel mediante correlaciones entre los comportamientos de las enzimas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Fenoles totales

Se registró un aumento en el contenido de fenoles totales de acuerdo al número de aplicaciones de los fungicidas (Figura 1). 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 (Agrios, 2007). Muchos fenoles y la oxidación de sus productos como las quinonas son altamente tóxicos al patógeno (Vidhyasekaran, 1988). En el 2000, Andreu, *et al.*, reportaron que la resistencia ocurre cuando una o más 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, el incremento de moléculas y enzimas de defensa ya que se mostró diferencia entre algunos de los tratamientos.

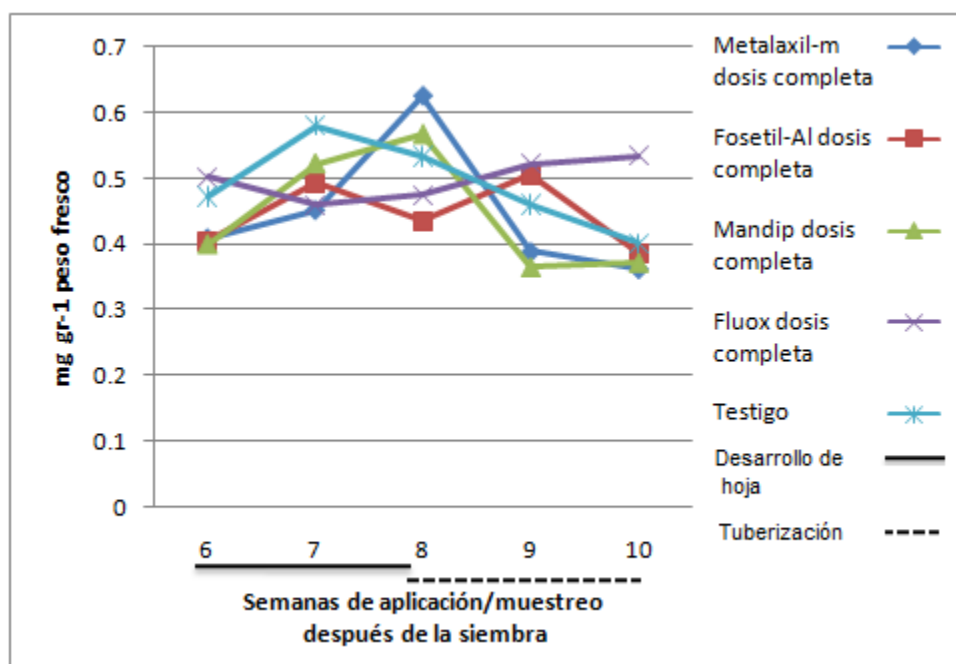


Fig.1. Actividad de fenoles totales a dosis completa.

En los tratamientos con fungicidas donde se aplicaron dosis completas se observó un aumento de fenoles totales dependiendo del fungicida. La acumulación de fenoles totales varió en cada muestreo, esto es que algunos fungicidas alcanzaron su punto máximo en los primeros muestreos y otros al

final. En el primer muestreo, el fungicida que presentó mayor acumulación de fenoles totales fue el Fluoxastrobin (Vigold®) con un valor de 0.5020 mg gr<sup>-1</sup> p. f., el mínimo valor se registró con el fungicida Mandipropamida (Revus®) 0.3996 mg gr<sup>-1</sup> p. f.). En este muestreo cabe resaltar que el testigo presentó un valor mayor a la mayoría de los tratamientos químicos. Para el caso de los muestreos siguientes los tratamientos se comportaron de manera similar, esto es que no hubo una gran diferencia significativa entre ellos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), así, en el segundo muestreo los tratamientos testigo, Mandipropamida y Fosetil-Al (Aliette®) no presentaron diferencias significativas con medias 0.5790, 0.5223 y 0.4930 mg gr<sup>-1</sup> p. f. respectivamente, siendo el testigo el que presentó el valor más alto; con diferencia significativa entre el testigo y los fungicidas Fluoxastrobin y Metalaxil-m (Ridomil®) con medias 0.4590 y 0.4520 mg gr<sup>-1</sup> p. f. respectivamente. Estos dos últimos tuvieron un comportamiento similar por lo tanto no hubo diferencia significativa entre ellos. Para el tercer muestreo, se observó una diferencia marcada entre el Metalaxil-m y Fosetil -Al con 0.6253 y 0.4347 mg gr<sup>-1</sup> p. f. respectivamente, siendo el primero que mostró la media más alta y el segundo el valor más bajo. Algo importante de destacar para este caso es que el testigo tuvo relación de una u otra forma con la mayoría de los tratamientos excepto con el Fosetil -Al. En el caso del cuarto muestreo el tratamiento que sobresalió fue el Fluoxastrobin con una media de 0.5220 mg gr<sup>-1</sup> p. f. sin embargo no hubo diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con los demás tratamientos, el valor más bajo se obtuvo con Mandipropamida con una media de 0.3643 mg gr<sup>-1</sup> p. f. Para el caso del quinto muestreo el resultado fue similar que en el cuarto muestreo solo que la media del Fluoxastrobin para este caso fue de 0.5343 mg gr<sup>-1</sup> p. f. y el valor más bajo se obtuvo con Metalaxil-m siendo la media de 0.3623 mg gr<sup>-1</sup> p. f.

En general, para los tratamientos a dosis completa, se observó que cada tratamiento llegó a su punto máximo de acumulación de fenoles totales en diferente muestreo, algunos en los primeros muestreos y otros al final, pudiendo coincidir o no con los demás.



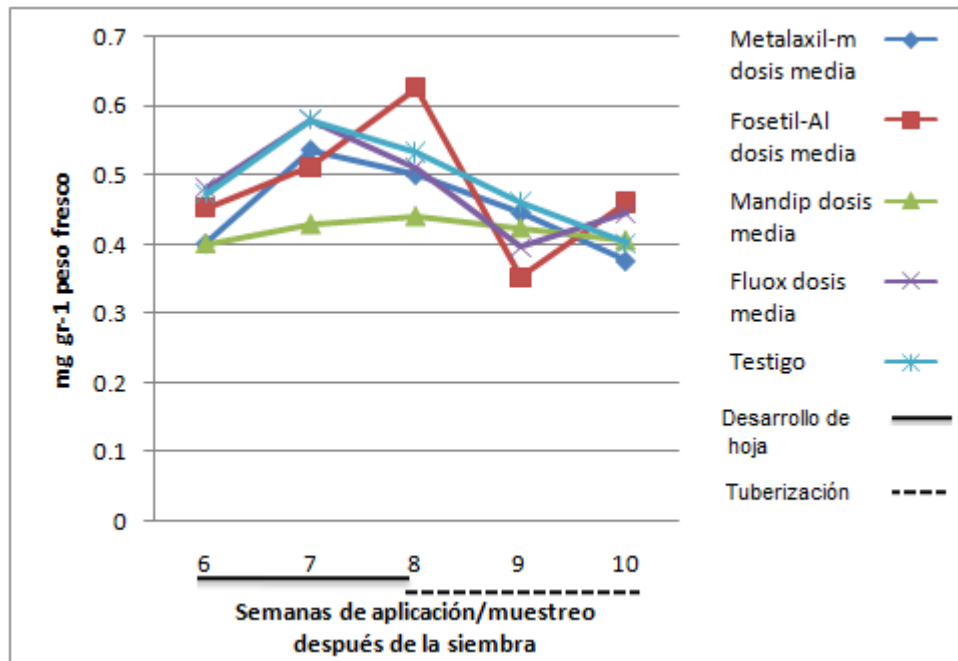


Fig. 2. Actividad de fenoles totales a media dosis.

En las plantas donde se aplicaron medias dosis (figura 2) se obtuvo un ligero cambio con los resultados de la dosis completa en la acumulación de fenoles totales. Para el primer muestreo el fungicida Fluoxastrobin y el testigo no presentaron diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) arrojando medias 0.4820 y 0.4726 mg gr-1 p. f. respectivamente, cabe mencionar que el primero mostró el valor más alto en este muestreo; el fungicida Mandipropamida mostró el valor mínimo de acumulación de fenoles con 0.4003 mg gr-1 p. f. el cuál resultó estadísticamente igual a Metalaxil-m con un valor de 0.4013 mg gr-1 p. f.

Para el segundo muestreo algunos tratamientos tuvieron un comportamiento similar al primero, en particular los que corresponden a Fluoxastrobin y testigo con una media 0.5790 mg gr-1 p.f. para ambos, a su vez resultaron diferentes estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con el fungicida que mostró el valor más bajo Mandipropamida con una media de 0.4280 mg gr-1 p.f., en el tercer muestreo el tratamiento con Fosetil-Al resultó tener el valor más alto de acumulación de fenoles con un valor de 0.6270 mg gr-1 p.f. el cuál a su vez tuvo diferencia significativa con los demás fungicidas excepto con el testigo que mostró una media de 0.5327 mg gr-1 p.f., el valor más bajo se observó con el fungicida Mandipropamida con una media de 0.4397 mg gr-1 p.f.

En el cuarto muestreo se observó una acumulación de fenoles que de una u otra manera se relacionaron todos los tratamientos, esto es que entre ellos no tuvieron diferencia significativa ((Tukey,  $P \leq 0.05$ ), así pues el tratamiento con mayor acumulación de fenoles fue el testigo con una media de 0.4603 mg gr-1 p.f. y el menor valor se obtuvo con el tratamiento Fosetil-Al 0.3523 mg gr-1 p.f., la misma relación se obtuvo en el quinto muestreo a diferencia de que el mayor valor de acumulación de fenoles lo obtuvo Fosetil-Al con una media de 0.4607 mg gr-1 p.f. y el valor más bajo se obtuvo con Metalaxil-m con una media de 0.3763 mg gr-1 p.f.

En general, la acumulación de fenoles para los diferentes fungicidas fue mayor a dosis media que a dosis completa, así también los mayores valores de acumulación de fenoles se obtuvieron en los muestreos dos y tres, observándose una disminución en los muestreos cuatro y cinco para la mayoría de los tratamientos (Cuadro 1, apéndice 1). Esto pudo atribuirse 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 habría que ver si las concentraciones obtenidas resultarían ser altamente tóxicas para patógenos. 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). Los fungicidas mencionados se utilizaron en este estudio, sin embargo los valores obtenidos muestran que otros fungicidas tuvieron mejor o igual efecto a estos, tal es el caso del Fluoxastrobin que en el caso de dosis completa resultó ser mejor que el Metalaxil-m obteniendo los valores más altos en tres de los cinco muestreos; para el caso de media dosis, el fungicida antes mencionado, resultó responder igual que el Fosetil-Al mostrando valores altos en dos de cinco muestreos.

## **6.2 Actividad de SOD**

Para el caso donde a las plantas se les aplicó dosis completa el fungicida con mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa fue Mandipropamida con 22.673 Ug<sup>-1</sup>p.f. aumentando su actividad en los muestreos posteriores y alcanzando su nivel máximo en el tercer muestreo con 74.290 Ug<sup>-1</sup>p.f (Figura

3). A su vez, en este primer muestreo, el tratamiento que presentó menor actividad fue Metalaxil-m con  $10.256 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$ , casi todos los tratamientos tuvieron diferencia significativa ((Tukey,  $P \leq 0.05$ ) excepto el Fluoxastrobin con el testigo, que mostraron valores de  $12.849$  y  $14.230 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  respectivamente (Cuadro 2, apéndice 1).

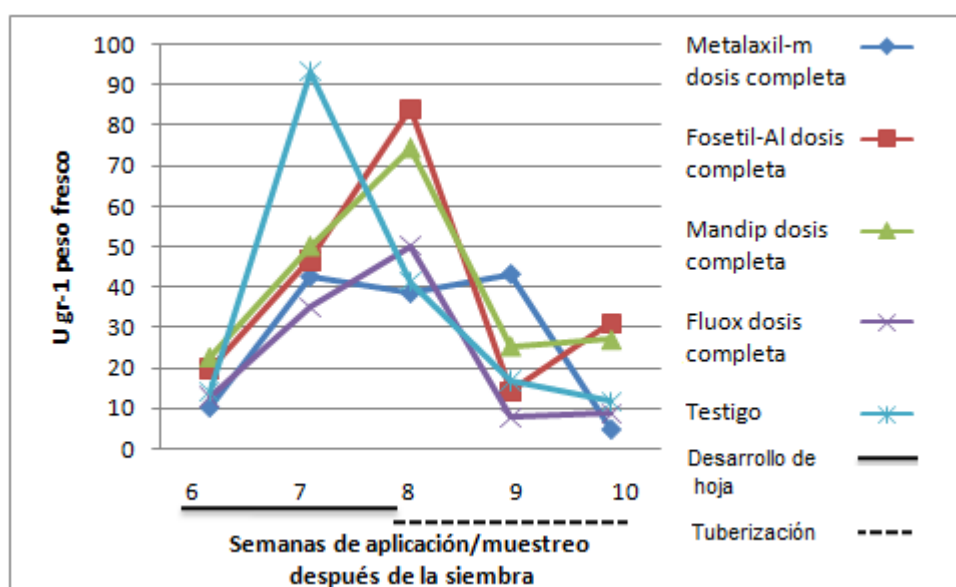


Fig. 3. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) a dosis completa.

Para la segunda semana de muestreo el testigo presentó una actividad de sod de  $93.400 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  siendo este valor el mayor que este tratamiento alcanzara puesto que en los posteriores muestreos la actividad disminuyó, el tratamiento que presentó menor actividad fue Fluoxastrobin con una media de  $35.070 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  pero solo presentó diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con el testigo. Para el tercer muestreo el fungicida Fosetil-Al mostró la mayor actividad de la enzima con una media de  $84.060 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$ , este a su vez no presentó diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con los fungicidas Mandipropamida y Fluoxastrobin con medias de  $74.290$  y  $50.190 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  respectivamente; en el caso de estos tres fungicidas, en este muestreo, mostraron el valor más alto de actividad ya que en los posteriores disminuyó. El tratamiento con menor valor de actividad fue Metalaxil-m con una media de  $38.370 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$

En el cuarto muestreo Metalaxil-m alcanzó su mayor valor de actividad de la SOD con una media de  $43.060 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$ , siendo así estadísticamente diferente a

los demás tratamientos ((Tukey,  $P \leq 0.05$ ); el tratamiento con menor valor de actividad fue Fluoxastrobin con una media de  $7.812 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  pero este a su vez fue estadísticamente igual a los tratamientos testigo y Fosetil-Al. En el último muestreo se observaron valores bajos, esto indica que para todos los tratamientos la actividad de la enzima disminuyó en los últimos muestreos, sin embargo se tuvieron diferencias significativas entre algunos tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El tratamiento con Fosetil-Al presentó el valor más alto de actividad de la enzima con una media de  $30.952 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  resultando igual estadísticamente con Mandipropamida que tuvo una media de  $27.009 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  y a su vez diferente con los demás tratamientos. El tratamiento con el valor más bajo de actividad fue Metalaxil-m con una media de  $4.836 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$

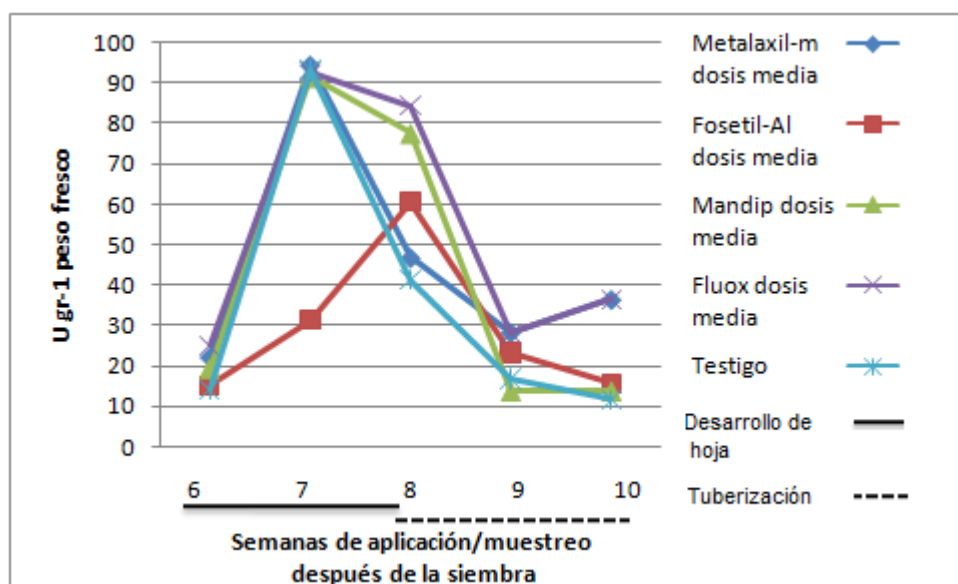


Fig. 4. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) a media dosis.

Para el caso donde las plantas fueron expuestas a medias dosis (figura 4), para el primer muestreo, el fungicida con el valor más alto de actividad de la SOD fue Fluoxastrobin con una media de  $25.136 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$ , el tratamiento con el valor más bajo fue el testigo con una media de  $14.230 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$ , este último no mostró diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con Fosetil-Al que tuvo una media de  $15.402 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  En el segundo muestreo los fungicidas Metalaxil-m, testigo, Fluoxastrobin y Mandipropamida fueron estadísticamente iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), teniendo medias de  $94.580$ ,  $93.400$ ,  $92.680$  y  $91.520 \text{ Ug}^{-1}\text{p.f.}$  respectivamente, algo importante de destacar es que estos valores son los

máximos que alcanzaron estos fungicidas, en los muestreos posteriores la actividad disminuyó.

Para el muestreo tres el más alto valor obtenido fue por el tratamiento Fluoxastrobin con una media de 28.134 Ug<sup>-1</sup>p.f el cuál no fue estadísticamente diferente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) a los tratamientos Mandipropamida y Fosetil-Al con medias 77.530 y 60.400 Ug<sup>-1</sup>p.f respectivamente; este último tratamiento alcanzó su valor máximo de actividad de la enzima en este muestreo. En el muestreo cuatro todos los tratamientos arrojaron valores menores a los tres muestreos anteriores, sin embargo en el quinto muestreo los tratamientos Metalaxil-m y Fluoxastrobin mostraron un ligero incremento, los demás siguieron a la baja. De acuerdo a lo anterior, para el muestreo cuatro, el valor más alto se obtuvo con los fungicidas Fluoxastrobin y Metalaxil-m con una media de 28.134 Ug<sup>-1</sup>p.f para ambos, el valor más bajo se observó con el tratamiento Mandipropamida con una media de 13.643 Ug<sup>-1</sup>p.f.

En el muestreo cinco, el fungicida Fluoxastrobin mostró el más alto valor con una media de 36.343 Ug<sup>-1</sup>p.f., el tratamiento con más bajo valor fue el testigo con una media de 11.895 Ug<sup>-1</sup>p.f.

En general, los valores más altos que reflejan la actividad enzimática para SOD se obtuvieron cuando los fungicidas se aplicaron a media dosis excepto Fosetil-Al que mostró mayor actividad al utilizarse a dosis completa, así también los mayores valores de actividad se obtuvieron en los muestreos dos y tres, observándose una disminución en los muestreo cuatro y cinco para la mayoría de los tratamientos (Cuadro 2, apéndice 1).

El fungicida que indujo los valores más altos en más muestreos, en dosis completa, fue el Fosetyl-Al el cual está dentro de los primeros reportes sobre la presencia de metabolitos que fueron descritos por Muller y Borger (Kuúc, 1995), ya que mostraron fuertes evidencias de la resistencia de las plantas a enfermedades al observar la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans* causada por la producción de compuestos fungitóxicos por la planta hospedera, aunque en este caso el patógeno estuvo ausente de las plantas tratadas con los diferentes tratamientos sí se observó un incremento de moléculas y enzimas involucradas en la defensa de la planta, además de que la acción curativa del Fosetil-Al ha sido correlacionada con la acumulación de la fitoalexina resveratrol en la vid (Deckers y Creasy, 1989).

Como se mencionó anteriormente, las plantas no estuvieron en contacto con ningún patógeno sin embargo los fungicidas utilizados están en la categoría de productos químicos sintéticos los cuales pueden inducir resistencia en las plantas de acuerdo a que una nueva alternativa de control de enfermedades de plantas se basa en la “resistencia inducida”, mediante la cual las plantas son protegidas de las enfermedades causadas por hongos, ya sea a través de una infección inicial por un patógeno (Kuúc, 1982) o por la aplicación de productos químicos sintéticos que activan respuestas de resistencia de la planta (White, 1979; Gottsein y Kuúc, 1989; Kessmann *et. al* 1994). Sin embargo las moléculas activadoras no deben ser tomadas como sustitutos de fungicidas, sino como una alternativa adicional dentro de una estrategia de manejo integrado (Lyon y Newton, 2000).

### **6.3 Actividad de POX**

La actividad de la peroxidasa 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 de un patógeno o algún otro factor, dando lugar a una mayor síntesis de etileno, este entonces comenzara la producción de fitoalexinas (Boller, 1992 y Robinson, 1991).

Cuando las plantas se sometieron a dosis completas de fungicidas (figura 5) en el primer muestreo, el tratamiento con mayor valor de actividad enzimática correspondió a Fosetil-AI con una media de 8214.200 Ugr<sup>-1</sup>p.f. el cuál tuvo diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con los demás tratamientos, a su vez el tratamiento con el valor más bajo de actividad fue el testigo con una media de 5362.200 Ugr<sup>-1</sup>p.f. Para el muestreo dos el tratamiento que mostró menor valor de actividad enzimática fue Fluoxastrobin con una media 6270.500 Ugr<sup>-1</sup>p.f., este tuvo diferencia significativa con los demás tratamientos; el tratamiento con mayor valor de actividad enzimática fue Fosetil-AI con una media de 9219.800 Ugr<sup>-1</sup>p.f (Cuadro 3, apéndice 1). Algo importante de destacar en el muestreo dos es que los tratamientos Metalaxil-m, Mandipropamida y testigo alcanzaron su mayor valor de actividad enzimática con medias de 8888.400, 8866.600 y 8342.100 Ugr<sup>-1</sup>p.f respectivamente, en los muestreos posteriores los valores fueron menores a estos, aunado a esto los tratamientos resultaron iguales estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

En el muestreo tres el tratamiento con Fosetil-AI mostró una media de actividad enzimática de 9961.900 Ugr<sup>-1</sup>p.f siendo estadísticamente diferente con los demás tratamientos presentando el mayor valor (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) además de que en este muestreo el fungicida alcanzó su mayor valor a dosis completa. Otro fungicida que alcanzó su mayor valor fue Fluoxastrobin con una media de 9291.300 Ugr<sup>-1</sup>p.f., el tratamiento que presentó el valor más bajo fue el testigo con una media de 7254.500 Ugr<sup>-1</sup>p.f.

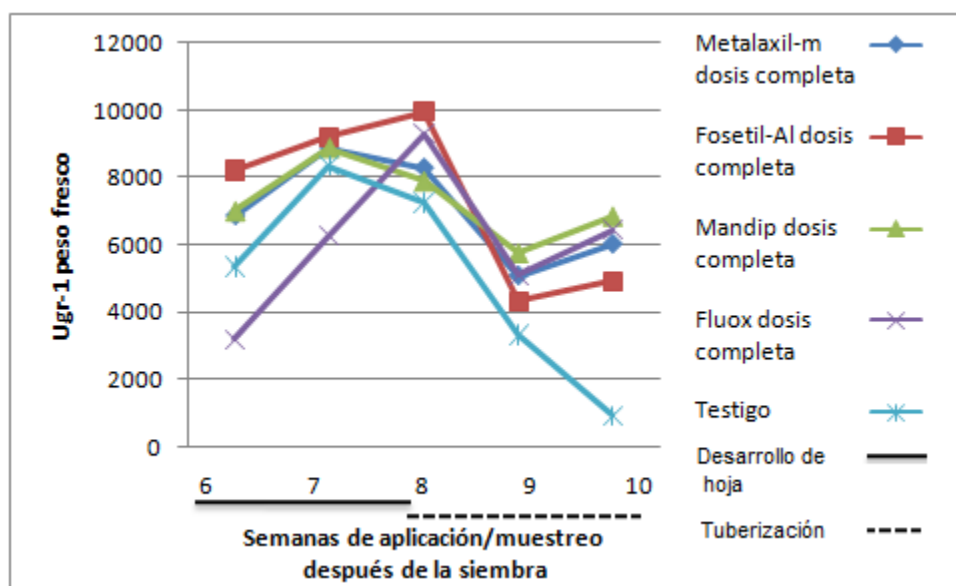


Fig. 5. Actividad enzimática de peroxidasa (POX) a dosis completa.

En el muestreo cuatro se observó una disminución en los valores para todos los tratamientos resultando que el tratamiento con mayor actividad enzimática fue el Mandipropamida con una media de 5766.100 Ugr<sup>-1</sup>p.f., así también el tratamiento con el más bajo valor resultó ser el testigo con una media de 3333.100 Ugr<sup>-1</sup>p.f., ambos mostrando diferencia significativa entre sí y los demás tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Para el quinto y último muestreo se observó que, exceptuando al testigo, todos los tratamientos incrementaron los valores obtenidos en el muestreo cuatro; así se obtuvo que Mandipropamida presentó el valor más alto con una media de 6846.300 Ugr<sup>-1</sup>p.f. y el más bajo fue de 4946.000 Ugr<sup>-1</sup>p.f. perteneciendo al fungicida Fosetil-AI, este último solo tomando en cuenta los fungicidas ya que tomando en cuenta todos los tratamientos, el testigo presentó el valor más bajo siendo la media de 953.100 Ugr<sup>-1</sup>p.f.

Cabe destacar que en este caso, dosis completa, para el tratamiento testigo la tendencia, después del muestreo dos, es un decremento a diferencia de los fungicidas los cuales mostraron un ligero incremento en el último muestreo aun cuando en el cuatro se observó una disminución marcada.

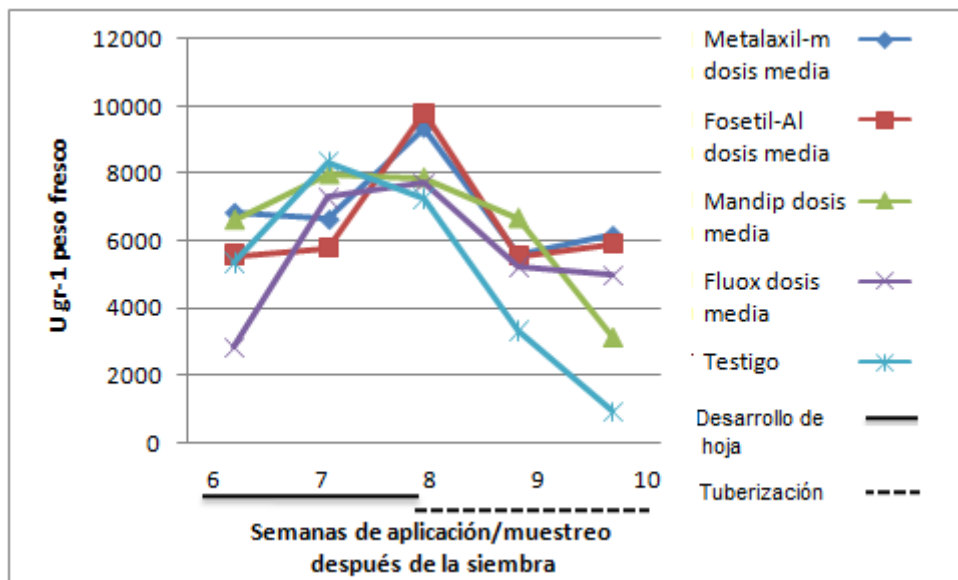


Fig. 6. Actividad enzimática de peroxidasa (POX) a dosis media.

Para el comportamiento de la enzima peroxidasa (POX) en las dosis medias de los fungicidas (figura 6) se obtuvo que, en el primer muestreo, el fungicida Metalaxil-m mostró el valor más alto de actividad enzimática con una media de 6828.400 Ugr<sup>-1</sup>p.f. sin embargo resultó igual estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con Mandipropamida que obtuvo una media de 6629.300 Ugr<sup>-1</sup>p.f., otros tratamientos que no presentaron diferencias significativas son Fosetil-Al y el testigo que presentaron medias de 5582.400 y 5362.200 Ugr<sup>-1</sup>p.f. respectivamente; el tratamiento con el valor más bajo fue el Fluoxastrobin con una media de 2836.400 Ugr<sup>-1</sup>p.f.

En el segundo muestreo, algunos tratamientos alcanzaron su máximo valor de actividad enzimática, como es el caso del testigo y Mandipropamida con medias de 8342.100 y 7977.300 Ugr<sup>-1</sup>p.f. respectivamente, siendo el primero que ocupará el valor más alto de actividad en este muestreo; el valor más bajo lo obtuvo el fungicida Fosetil-Al con una media de 5804.300 Ugr<sup>-1</sup>p.f., mostrando diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con todos los demás tratamientos.



En el muestreo tres hubo tratamientos que alcanzaron su máximo valor de actividad, estos fueron Fosetil-Al, Metalaxil-m y Fluoxastrobin con medias 9792.000, 9343.700 y 7721.500 Ugr<sup>1</sup>p.f. respectivamente, siendo el primero el que mostró el valor más alto en el muestreo en cuestión resultando estadísticamente igual (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) al Metalaxil-m. El tratamiento con el valor más bajo es el testigo, con una media de 7254.500 Ugr<sup>1</sup>p.f.

En el muestreo cuatro se observó la disminución de la actividad enzimática para todos los tratamientos, así se obtuvo que el fungicida Mandipropamida mostró el valor más alto de actividad enzimática, con una media de 6675.900 Ugr<sup>1</sup>p.f. resultando estadísticamente diferente con los demás tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), el valor más bajo se observó con el tratamiento testigo con una media de 3333.100 Ugr<sup>1</sup>p.f. Para el muestreo cinco el tratamiento con el valor más alto fue Metalaxil-m con una media de 6151.600 Ugr<sup>1</sup>p.f. y el valor más bajo se obtuvo con el tratamiento testigo con una media de 953.100 Ugr<sup>1</sup>p.f., cabe mencionar que algunos tratamientos como son el Metalaxil-m y Fosetil-Al mostraron un ligero incremento en los valores de actividad enzimática cuando en el muestreo cuatro mostraron un decremento notable.

En general los valores más altos se obtuvieron en los primeros tres muestreos y a dosis completa, en los muestreos cuatro y cinco en esta dosis se observó un decremento. Para el caso de la dosis media dio mejor resultado en los muestreos cuatro y cinco para la mayoría de los tratamientos; así también los mayores valores de actividad se obtuvieron en los muestreos dos y tres, observándose una disminución en los muestreos cuatro y cinco para la mayoría de los tratamientos (Cuadro 3, apéndice 1). Los valores más altos obtenidos en los diferentes muestreos no correspondieron a un solo ingrediente activo sin embargo hubo algunos que sobresalieron en dos o más muestreos tanto en dosis completa como en dosis media, así tenemos que para el caso de dosis completa el fungicida que más veces sobresalió fue el Fosetil-Al y en dosis media fue el Metalaxil-m, esto coincide con algunos reportes en donde la síntesis de fitoalexinas fue correlacionada con la aplicación de fungicidas como el metalaxil usado contra *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Cahill y Ward, 1989) y el Fosetyl-Al correlacionando su acción curativa con acumulación de la fitoalexina resveratrol en vid (Deckers y Creasy, 1989); en

este caso para la enzima PEROXIDASA estos fungicidas incrementaron su actividad en ausencia de patógenos.

#### 6.4 Actividad de catalasa

Cuando las plantas se sometieron a dosis completas de fungicidas (figura 7) en el primer muestreo, el tratamiento con mayor valor de actividad enzimática correspondió al tratamiento testigo con una media de 41310 Ugr<sup>-1</sup>p.f. el cuál tuvo diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con los demás tratamientos, a su vez el tratamiento con el valor más bajo de actividad fue el Metalaxil-m con una media de 15459 Ugr<sup>-1</sup>p.f. Para el muestreo dos el tratamiento que mostró menor valor de actividad enzimática fue Fluoxastrobin con una media 17931 Ugr<sup>-1</sup>p.f., el tratamiento con mayor valor de actividad enzimática fue nuevamente el testigo con una media de 22796 Ugr<sup>-1</sup>p.f (Cuadro 4, apéndice 1) resultando estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) igual a Mandipropamida y Metalaxil-m. Algo importante de destacar es que para el caso de los tratamientos testigo y Mandipropamida alcanzaron su mayor valor de actividad enzimática con medias de 41310 y 26170 Ugr<sup>-1</sup>p.f respectivamente en el muestreo uno, en los posteriores los valores fueron menores a estos.

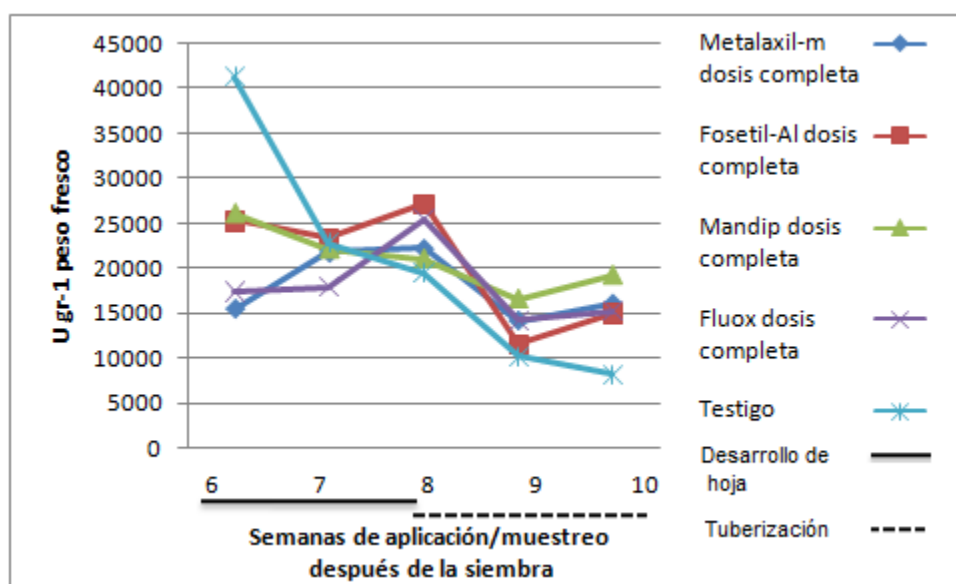


Fig. 7. Actividad enzimática de catalasa a dosis completa.

En el muestreo tres el tratamiento con Fosetil-Al mostró una media de actividad enzimática de 27143.4Ugr<sup>-1</sup>p.f presentando el mayor valor además de que en este muestreo el fungicida alcanzó su mayor valor a dosis completa. Otros

fungicidas que alcanzaron su mayor valor fueron Fluoxastrobin y Metalaxil-m con medias de 25410.6 y 22204.9 Ugr<sup>-1</sup>p.f. respectivamente, el tratamiento que presentó el valor más bajo fue el testigo con una media de 19456.2 Ugr<sup>-1</sup>p.f.

En el muestreo cuatro se observó una disminución en los valores para todos los tratamientos resultando que el de mayor actividad enzimática fue Mandipropamida con una media de 16557Ugr<sup>-1</sup>p.f., así también el tratamiento con el más bajo valor resultó ser el testigo con una media de 10133Ugr<sup>-1</sup>p.f., ambos mostrando diferencia significativa entre sí (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Para el quinto y último muestreo se observó que, exceptuando al testigo, todos los tratamientos incrementaron los valores obtenidos en el muestreo cuatro; así se obtuvo que Mandipropamida presentó el valor más alto con una media de 19240Ugr<sup>-1</sup>p.f. y el más bajo fue de 15048Ugr<sup>-1</sup>p.f. perteneciendo al fungicida Fosetil-AI, esto último solo tomando en cuenta los fungicidas ya que tomando en cuenta todos los tratamientos, el testigo presentó el valor más bajo siendo la media de 8175Ugr<sup>-1</sup>p.f. Cabe destacar que en este caso, dosis completa para el tratamiento testigo, la tendencia después del muestreo dos, es un decremento a diferencia de los fungicidas los cuales mostraron un ligero incremento en el último muestreo aun cuando en el cuatro se observó una disminución marcada. Para el comportamiento de la catalasa en dosis medias de los fungicidas (figura 8) se obtuvo que, en el primer muestreo, el tratamiento testigo mostró el valor más alto de actividad con una media de 41310Ugr<sup>-1</sup>p.f. resultando estadísticamente diferente a los demás tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), el tratamiento con el valor más bajo fue Metalaxil-m con una media de 14205Ugr<sup>-1</sup>p.f. en este muestreo el tratamiento testigo y Mandipropamida alcanzaron su valor más alto de actividad.

En el segundo muestreo el valor más alto se obtuvo con Fosetil-AI con una media de 27343Ugr<sup>-1</sup>p.f., el valor más bajo lo obtuvo el fungicida Metalaxil-m con una media de 16757Ugr<sup>-1</sup>p.f., mostrando diferencia significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) solo con Fosetil-AI.

En el muestreo tres hubo tratamientos que alcanzaron su máximo valor de actividad, estos fueron Fosetil-AI, Metalaxil-m y Fluoxastrobin con medias 29511.8, 26350.7 y 21512.6 Ugr<sup>-1</sup>p.f. respectivamente, siendo el primero el que mostró el valor más alto en el muestreo en cuestión resultando

estadísticamente igual (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) al Metalaxil-m. El tratamiento con el valor más bajo fue el testigo, con una media de 19456.2 Ugr<sup>-1</sup>p.f.

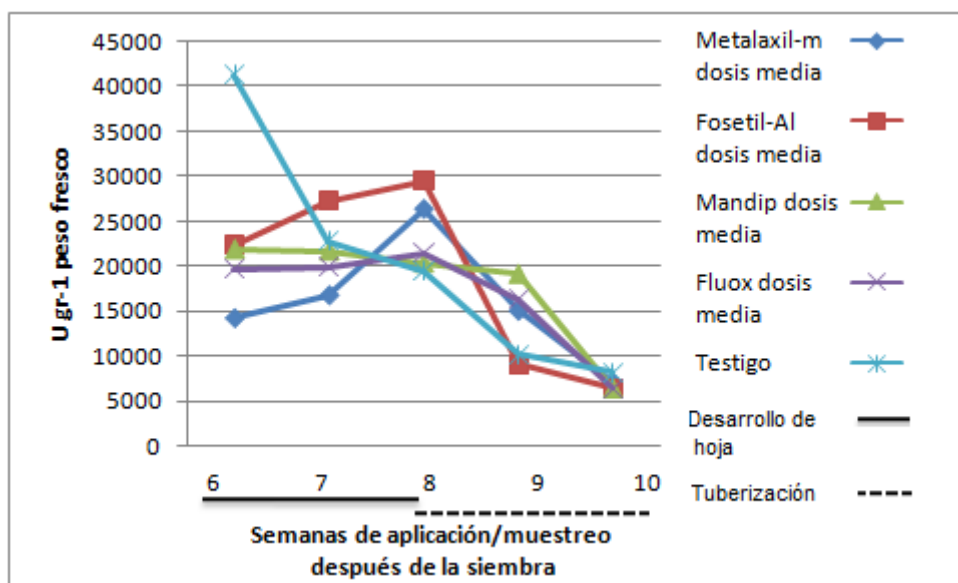


Fig. 8. Actividad enzimática de catalasa a dosis media.

A partir del muestreo cuatro se observó la disminución de actividad enzimática para todos los tratamientos, así se obtuvo que el fungicida Mandipropamida mostró el valor más alto de actividad, con una media de 19124Ugr<sup>-1</sup>p.f. resultando estadísticamente diferente con la mayoría de los tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) excepto con Fluoxastrobin, el valor más bajo se observó con Fosetil-Al con una media de 9034Ugr<sup>-1</sup>p.f. Para el muestreo cinco el tratamiento con el valor más alto fue el testigo con una media de 8175Ugr<sup>-1</sup>p.f. y el valor más bajo se obtuvo con Mandipropamida con una media de 6353 Ugr<sup>-1</sup>p.f.

En general los valores más altos se obtuvieron en los primeros tres muestreos sobresaliendo el número tres en ambas dosis, en el cuatro y cinco se observó un decremento (Cuadro 4, apéndice 1). Los valores más altos obtenidos en los diferentes muestreos no correspondieron a un solo ingrediente activo sin embargo hubo algunos que sobresalieron en dos o más tanto en dosis completa como en dosis media, así tenemos que para el caso de dosis completa el fungicida que más veces sobresalió fue Mandipropamida en tres de cinco muestreos, sin embargo los valores fueron menores a los resultantes del Fosetil-Al que sobresalió en dos de cinco muestreos, en dosis media el fungicida que sobresalió en tres de cinco muestreos fue el Fosetil-Al. Las actividades de la peroxidasa y catalasa han sido estudiadas por Rudolph y

Stahmann en cuanto al papel que estas enzimas pueden tener en la virulencia de *Pseudomonas phaseolicola* y la susceptibilidad de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) a este patógeno. Estos autores observaron que, para el caso de la peroxidasa, la actividad se mantuvo sin cambios en la exposición de una planta de frijol susceptible a una cepa virulenta de *P. phaseolicola* pero la misma aumentó cuando la planta de frijol estuvo en contacto con una cepa menos virulenta. Análogamente la actividad peroxidasa mostró un mayor aumento después de la infección con una cepa virulenta en una variedad de frijol resistente a diferencia de lo que hizo en una variedad susceptible. Por lo tanto, parece que una actividad elevada de la peroxidasa favorece a la resistencia a *P. phaseolicola*. La evidencia indirecta de esta afirmación se deriva de una comparación de cepas aisladas de *P. phaseolicola*, mostrando que los aislados virulentos contenían una mayor actividad de catalasa que los menos virulentos. A partir de estas observaciones, podría parecer que el aumento de actividad de la catalasa contenida en los aislados virulentos reduce la eficacia de las defensas naturales de la planta de frijol. Se propuso que esto se logró por una supresión de la actividad de la peroxidasa, específicamente por la destrucción de sustrato de la enzima peroxidasa por la enzima catalasa. El resultado de la interacción entre estas dos enzimas en una planta de frijol susceptible infectada por un aislado virulento de *P. phaseolicola* parece ser un potencial *redox* que favorece la presencia de compuestos fenólicos en su forma reducida en lugar de quinonas como compuestos antimicrobianos activos.

Con lo anterior se puede observar que la enzima catalasa está estrechamente relacionada con la enzima peroxidasa, esto se puede observar con la correlación POX/CAT la cual resultó significativa en más de un tratamiento (ver cuadros 4, 5 y 6).

### **6.5 Análisis de correlación**

Las correlaciones entre variables para cada tratamiento se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de  $\alpha=0.05$ . La correlación que resultó significativa en el tratamiento donde se utilizó el fungicida Metalaxil-m a dosis completa fue para POX/CAT ( $r= 0.93518^*$ ), en media dosis no se obtuvieron correlaciones significativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Correlación entre variables para Metalaxil-m (Ridomil Gold®) en dosis completa y media.

| DOSIS COMPLETA |     | FEN     | SOD                             | POX                             | CAT                             |
|----------------|-----|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                | FEN | 1.00000 | 0.46927 <sup>ns</sup><br>0.4252 | 0.66784 <sup>ns</sup><br>0.2180 | 0.79538 <sup>ns</sup><br>0.1076 |
|                | SOD |         | 1.00000                         | 0.31060 <sup>ns</sup><br>0.6110 | 0.46092 <sup>ns</sup><br>0.4346 |
|                | POX |         |                                 | 1.00000                         | 0.93518 <sup>**</sup><br>0.0196 |
|                | CAT |         |                                 |                                 | 1.00000                         |
| MEDIA DOSIS    |     | FEN     | SOD                             | POX                             | CAT                             |
|                | FEN | 1.0000  | 0.80288 <sup>ns</sup><br>0.1019 | 0.42422 <sup>ns</sup><br>0.4765 | 0.72445 <sup>ns</sup><br>0.1663 |
|                | SOD |         | 1.0000                          | 0.12515 <sup>ns</sup><br>0.8411 | 0.23818 <sup>ns</sup><br>0.6996 |
|                | POX |         |                                 | 1.00000                         | 0.82887 <sup>ns</sup><br>0.0828 |
|                | CAT |         |                                 |                                 | 1.0000                          |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, SOD: Superóxido dismutasa, POX: Peroxidasa, CAT= Catalasa. ns: No significativo, \*\*: significativo

Para el caso del fungicida Fosetil-AI, en dosis completa, la única correlación que resultó significativa fue POX/CAT ( $r=0.96534$ ) las demás resultaron no significativas; igualmente a dosis media la correlación que resultó significativa fue SOD/POX ( $r=0.93533$ ) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlación entre variables para Fosetil-AI (Aliette®) en dosis completa y media.

| DOSIS COMPLETA |     | FEN     | SOD                              | POX                              | CAT                              |
|----------------|-----|---------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                | FEN | 1.00000 | -0.05682 <sup>ns</sup><br>0.9277 | -0.02546 <sup>ns</sup><br>0.9676 | -0.24382 <sup>ns</sup><br>0.6927 |
|                | SOD |         | 1.00000                          | 0.73532 <sup>ns</sup><br>0.1568  | 0.65113 <sup>ns</sup><br>0.2340  |
|                | POX |         |                                  | 1.00000                          | 0.96534 <sup>**</sup><br>0.0077  |
|                | CAT |         |                                  |                                  | 1.00000                          |
| MEDIA DOSIS    |     | FEN     | SOD                              | POX                              | CAT                              |
|                | FEN | 1.0000  | 0.81043 <sup>ns</sup><br>0.0962  | 0.84394 <sup>ns</sup><br>0.0722  | 0.76237 <sup>ns</sup><br>0.1340  |

|  |     |  |        |                     |                                 |
|--|-----|--|--------|---------------------|---------------------------------|
|  | SOD |  | 1.0000 | 0.93533**<br>0.0195 | 0.66939 <sup>ns</sup><br>0.2165 |
|  | POX |  |        | 1.00000             | 0.55035 <sup>ns</sup><br>0.3365 |
|  | CAT |  |        |                     | 1.0000                          |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, SOD: Superoxido dismutasa, POX: Peroxidasa, CAT= Catalasa. ns: No significativo, \*\*: significativo

Con el fungicida Mandipropamida, dosis completa, la correlación FEN/SOD ( $r=0.95417$ ) resultó significativa. A dosis media se obtuvo a la correlación POX/CAT ( $r=0.94511$ ) como significativa (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Correlación entre variables para Mandipropamida (Revus®) en dosis completa y media.**

|                       |     | FEN     | SOD                             | POX                             | CAT                             |
|-----------------------|-----|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>DOSIS COMPLETA</b> | FEN | 1.00000 | 0.95417**<br>0.0117             | 0.83383 <sup>ns</sup><br>0.0793 | 0.26542 <sup>ns</sup><br>0.6661 |
|                       | SOD |         | 1.00000                         | 0.67146 <sup>ns</sup><br>0.2146 | 0.04037 <sup>ns</sup><br>0.9486 |
|                       | POX |         |                                 | 1.00000                         | 0.47827 <sup>ns</sup><br>0.4151 |
|                       | CAT |         |                                 |                                 | 1.00000                         |
|                       |     |         |                                 |                                 |                                 |
| <b>MEDIA DOSIS</b>    | FEN | 1.0000  | 0.76031 <sup>ns</sup><br>0.1357 | 0.68324 <sup>ns</sup><br>0.2035 | 0.41991 <sup>ns</sup><br>0.4815 |
|                       | SOD |         | 1.0000                          | 0.69959 <sup>ns</sup><br>0.1885 | 0.47906 <sup>ns</sup><br>0.4142 |
|                       | POX |         |                                 | 1.00000                         | 0.94511**<br>0.0153             |
|                       | CAT |         |                                 |                                 | 1.0000                          |
|                       |     |         |                                 |                                 |                                 |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, SOD: Superoxido dismutasa, POX: Peroxidasa, CAT= Catalasa. ns: No significativo, \*\*: significativo

En el tratamiento donde se utilizó el fungicida Fluoxastrobin, a dosis completa, se obtuvo que la correlación SOD/CAT ( $r= 0.91422$ ) fue la única significativa. A dosis media la correlación SOD/POX ( $r=0.89667$ ) resultó significativa (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Correlación entre variables para Fluoxastrobin (Vigold®) en dosis completa y media.**

|                   |     |         |                                  |                                  |                                  |
|-------------------|-----|---------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| DOSIS<br>COMPLETA |     | FEN     | SOD                              | POX                              | CAT                              |
|                   | FEN | 1.00000 | -0.85538 <sup>ns</sup><br>0.0646 | -0.37560 <sup>ns</sup><br>0.5333 | -0.65695 <sup>ns</sup><br>0.2284 |
|                   | SOD |         | 1.00000                          | 0.76754 <sup>ns</sup><br>0.1298  | 0.91422 <sup>**</sup><br>0.0298  |
|                   | POX |         |                                  | 1.00000                          | 0.72211 <sup>ns</sup><br>0.1683  |
|                   | CAT |         |                                  |                                  | 1.00000                          |
| MEDIA<br>DOSIS    |     | FEN     | SOD                              | POX                              | CAT                              |
|                   | FEN | 1.0000  | 0.83704 <sup>ns</sup><br>0.0770  | 0.51224 <sup>ns</sup><br>0.3776  | 0.51266 <sup>ns</sup><br>0.3771  |
|                   | SOD |         | 1.0000                           | 0.89667 <sup>**</sup><br>0.0393  | 0.47437 <sup>ns</sup><br>0.4195  |
|                   | POX |         |                                  | 1.00000                          | 0.28944 <sup>ns</sup><br>0.6367  |
|                   | CAT |         |                                  |                                  | 1.0000                           |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, SOD: Superóxido dismutasa, POX: Peroxidasa, CAT= Catalasa. ns: No significativo, \*\*: significativo

En el tratamiento testigo las correlaciones que resultaron significativas fueron FEN/SOD y FEN/POX con ( $r=0.89371$ ) y ( $r=0.97383$ ) respectivamente (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Correlación entre variables para el tratamiento Testigo (agua).**

|     |         |                                 |                                 |                                 |
|-----|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|     | FEN     | SOD                             | POX                             | CAT                             |
| FEN | 1.00000 | 0.89371 <sup>**</sup><br>0.0409 | 0.97383 <sup>**</sup><br>0.0051 | 0.32903 <sup>ns</sup><br>0.5888 |
| SOD |         | 1.00000                         | 0.79329 <sup>ns</sup><br>0.1093 | 0.09153 <sup>ns</sup><br>0.8836 |
| POX |         |                                 | 1.00000                         | 0.50806 <sup>ns</sup><br>0.3821 |
| CAT |         |                                 |                                 | 1.00000                         |

\*Nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . FEN: Fenoles, SOD: Superóxido dismutasa, POX: Peroxidasa, CAT= Catalasa. ns: No significativo, \*\*: significativo

Metalaxil-m obtuvo solo una correlación significativa a dosis completa siendo POX/CAT, esta se repitió con el fungicida Fosetil-Al a dosis completa y a dosis media con el fungicida Mandipropamida. Las correlaciones donde están



involucrados los fenoles se obtuvieron para el caso del testigo y el fungicida Mandipropamida en su dosis completa. La correlación SOD/POX resultó significativa a dosis media en los fungicidas Fosetil-Al y Fluoxastrobin. La única combinación de correlación que no resultó significativa fue FEN/CAT.

En general, en dosis completa, los fungicidas que coincidieron en las correlaciones fueron Metalaxil-m y Fosetil-Al con POX/CAT y Mandipropamida-testigo coincidieron en que sus correlaciones resultaron asociadas con los fenoles. En dosis media los fungicidas Fosetil-Al y Fluoxastrobin coincidieron con SOD/POX.

Lo anterior muestra que los cambios inducidos en cada una de las enzimas analizadas influyeron entre sí, o sea que los productos actuaron y repercutieron en las plantas de manera dependiente para las diferentes enzimas. La respuesta de defensa de fitoalexinas implica la activación rápida de genes de transcripción que codifican un número de enzimas de fitoalexinas (Manibhushanrao *et al.*, 1988).

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

Considerando que los fungicidas se enfocan también sobre su efecto en el hospedante, es importante saber hasta qué punto los productos estimulan las reacciones de defensa de la planta. En este caso se incluyeron tratamientos muy limitados ya que faltaría observar la reacción de los mismos tratamientos, bajo las mismas condiciones pero teniendo al patógeno *Phytophthora infestans* presente. Algunos fungicidas no son específicos contra oomicetos, como para estudiar hasta qué 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. En general, hubo similitud entre los patrones de síntesis y/o actividad de los metabolitos de defensa estimulados por los productos. Así, a medida que aumentaron las veces de aplicación de los productos se detectaron incrementos en fenoles (FEN), en superóxido dismutasa (SOD), en peroxidasa (POX) y en catalasa (CAT), tanto en dosis completa como en media. Destaca el estímulo inducido por los fungicidas Fosetil-AI, fluoxastrobin y metalaxil-m, tanto en dosis media como en completa. El primer producto es contra oomicetos, aunque su aplicación se hizo en ausencia del patógeno. Las similitudes de respuesta bioquímica en la mayoría de las combinaciones metabolito-agroquímico se respaldan con las correlaciones obtenidas entre las variables, lo que refleja la estrecha interacción o actividad conjunta entre los metabolitos cuantificados. Los productos incluidos en el presente estudio estimulan respuestas comunes de defensa enzimática en ausencia de patógenos, sin embargo existen publicaciones en las cuales *Solanum tuberosum* y otras especies se han sujeto a diferentes situaciones, por ejemplo, se ha trabajado con activación enzimática de especies de *Solanum* obteniendo que las mismas activan mecanismos enzimáticos de defensa contra el patógeno *P. infestans* de manera poligénica y simultánea (fenoles totales, fenilalanina amonio-liasa, peroxidasa y superóxido dismutasa), pero aquellas resistentes respondieron antes y con mayor intensidad que la especie susceptible (Juárez *et. al.* 2010). Al trabajar con clones de papa y su relación con enzimas de defensa se obtuvo que una respuesta diferencial en la actividad enzimática de defensa entre genotipos. Se esperaba que a mayor presencia de fenoles menor infección pero no sucedió

de esta manera, pero sí en la actividad de POX y PAL. Los fungicidas indujeron reacciones de defensa en menor intensidad en las plantas tratadas. Hubo variación en la correlación entre variables de acuerdo con el grado de resistencia de los genotipos, siendo el susceptible el que tuvo menores correlaciones que los resistentes (Rivera *et. al.*2007). Cuando en *Solanum tuberosum* está presente el virus X de la papa (PVX) se ha observado que la infección viral, induce mayor actividad metabólica y resistencia temporal temprana, pero sin consecuencias posteriores, la presencia y actividad de los metabolitos tiene relación con la resistencia genética del hospedante (Almanza *et. al.*, 2006). Al aplicar fungicidas no específicos (cuadro 6, apéndice 1) contra *Phytophthora infestans* en papa se obtuvo que estos estimularon 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 (Robledo *et. al.*, 2012). En cuanto a las correlaciones, del presente trabajo con los ya mencionados, el resultado fue parecido, esto es que al menos una de las correlaciones significativas aquí obtenidas fueron las mismas que en esos trabajos pero bajo diferentes circunstancias. Finalmente la hipótesis respecto a que a mayor dosis de los productos correspondería mayor actividad enzimática no se cumplió dado que a dosis media, para todos los productos, se observó mayor actividad enzimática, específicamente durante la actividad metabólica de la planta. Esto es que la planta reaccionó más a defenderse con media dosis puesto que a dosis completa tuvo la cantidad suficiente de fungicida para controlar algún patógeno que se pudiera presentar.

## **8. CONCLUSIONES**

La aplicación de fungicidas al follaje de papa en ausencia del patógeno estimuló la síntesis y acción de las enzimas de defensa incluidas en el presente estudio. Esta respuesta se vio más favorecida con medias dosis de los productos, principalmente en las fases intermedias de crecimiento de la planta. Las correlaciones significativas indican similitud de respuestas de algunas enzimas de la planta a más de un producto, evidenciando reacciones no específicas por el estímulo químico externo.

## 9. LITERATURA CITADA

- ❖ Agrios G. N., Fitopatología. 2007. 819 p.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.
- ❖ Almanza S. M. G., Lozoya S. H. y Colinas L. M. T. 2006. Infección mixta *Phytophthora infestans*- Virus x de la papa (PVX) y mecanismos de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.). Agrociencia 6: 753-764.
- ❖ 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.
- ❖ Arauz Cavallini F. 1998. Fitopatología: Un enfoque agroecológico. San José Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica. 467 p.p.
- ❖ Beauverie J. 1901. Essais d'immunization des vegetaux contre les maladies cryptogamiques. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris 133: 107-110.
- ❖ Beyer F., Fridovich W. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analyt. Biochem. 161:559-566.
- ❖ Boller T. 1992. Biochemical analysis of chitinases and b-1,3 glucanases. Practical Methods. pp. 23-30. In: Bowles D., S. Gurr. (eds.). *Molecular Plant Pathology*. Oxford.
- ❖ Boller T., Geheri A., Mauch F. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. 157: 22-31.
- ❖ 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.
- ❖ Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. 1994. Superoxide dismutase in plants. Rev. Plant. Sci 13: 199-218.
- ❖ Browning J. A. 1980. Genetic protective mechanism of plant pathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. In M. K. Harris. (Ed.). *Biology and Breeding for resistance to arthropods and*

- pathogens in agricultural plants*. Texas Agricultural Station Miscellaneous Publication. 1451:52-75.
- ❖ 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.
  - ❖ Carter G. A., Chamberlain K., Wain R. L. 1978. Investigations on fungicides. XX. The fungitoxicity of analogues of the phytoalexin 2-(2'methoxy-4'-hydroxyphenyl)-6-methoxy-benzofuran (vignafuran). *Annals of Applied Biology* 88: 57-64.
  - ❖ Chester K. 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quart. Rev. Biol.* 8: 129-151.
  - ❖ Collinge D. B., Borch J; Madriz-Ordeana K., Newman M-A. 2001. The responses of plants to pathogens. *In* Hawkesford, MJ; Buchner, P. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.
  - ❖ Collinge D. B., Gregersen P., Thordal-Christensen H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *In* *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
  - ❖ Consumo per cápita de papa. Recuperado el 28 de diciembre del 2012 de <http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/papa/Descripción.pdf>
  - ❖ Converso D. A y Fernández M. E. 1996. Ca<sup>2+</sup> activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch Biochem Biophys* 333: 59-65.
  - ❖ Cornide, M. T., Lima H., y Surlí J. 1994. *La Resistencia Genética de las Plantas Cultivadas*. Editorial Científico- Técnica. La Habana, Cuba. 194 p.
  - ❖ Dai G. H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D. 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Eur. J. Plan Pathol.* 101:541-547.
  - ❖ Darvill A.G., Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their elicitors- A defence against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:243-275.

- ❖ De Wit PJGM. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science* 2:452 - 458.
- ❖ Deckers W. and Creasy L., 1989. Influence of fosetyl-AI on phytoalexin accumulation in *Plasmopara viticola*- grapevine interaction. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 34:203-213.
- ❖ Doubrava N. S., Dean R. A., Kuúc J. 1988. Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33:69-79.
- ❖ Eisenstadt MA, Bogolitsyn KG.2010. Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds. *Bioorg Khim* 36: 802-815.
- ❖ Fenología de la papa. Recuperado el 20 de marzo del 2014 de <http://www.sqm.com/es-es/productos/nutricionvegetaldeespecilidad/cultivos/papa.aspx>
- ❖ Flurkey W. H., and J. J Jen. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.* 43: 1828-1831.
- ❖ García M. R. y Pérez L. R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente.* 1: 5-10.
- ❖ 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.
- ❖ Gottsein H. D. and Kuúc J. 1989. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathology* 79:176-179.
- ❖ Green T. R., Ryan C. A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves a possible defense mechanism against insects. *Science* 175 776-777.
- ❖ 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.
- ❖ Haukioja E., Hakala T. 1975. Herbivore cycles and periodic outbreaks. Formulation of a general hypothesis. *Report of the Kevo Subarctic Research Station* 12: 1-9.

- ❖ Heath M. C. 2000a. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- ❖ Heath M. C. 2000b. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- ❖ 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.
- ❖ Hutcheson S. W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36:59-90.
- ❖ Jespersen H. M., Kjaersgaard IV, Østergaard L. y Welinder K. G. 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 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.
- ❖ Juárez C. A., Lozoya S. H., Colinas L. M. T. y Bamberg J. 2010. Activación enzimática de especies de *Solanum* contra *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary). *Interciencia* 8: 586-591.
- ❖ Karban R., Kuć J. 2000. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. *In* Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture. Agrawal, AA; Tuzun, S; Bent, E. Ed. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. p. 1-16.
- ❖ 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.
- ❖ Kuć J. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32:854-860.
- ❖ Kuć J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. *In* Innovative approaches to plant disease control. Chet, I. Ed. New York, John Wiley. p. 255-274.
- ❖ Kuć J. 1993. Non pesticide control of plant disease by immunization. *In* Lyr, H; Potter, C Ed. Stuttgart, Ullmer Publication. p. 225-237.
- ❖ Kuć J. 1995. Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. *Annual Review Phytopathology.* 33: 273-297.



- ❖ Kuúc J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.
- ❖ Kuúc J., Barnes E., Daftsios A., Williams E. 1959. The effect of amino acids on susceptibility of apple varieties to scab. *Phytopathology* 49:313-315.
- ❖ Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 273:10630-10637.
- ❖ Loebenstein G. 1963. Further evidence on systemic resistance induced by localized necrotic virus infections in plants. *Phytopathology* 53:306-308.
- ❖ Lozoya-Saldaña, H., G. Almanza-Serrano, y M.T. Colinas-León. 2006. Infección mixta *Phytophthora infestans*-Virus X de la papa (PVX) y mecanismos de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agrociencia* 40: 753-764.
- ❖ Lyon G. D., Newton A. C. 2000. Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. *In* Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture. Agrawal, AA; Tuzun, S; Bent, E. Eds. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. p. 299-318.
- ❖ Manibhushanrao K., Mohammed Z., and N. Matsuyama. 1988. Phenol Metabolism and Plant Disease Resistance. *Acta Phytopathol. Et Entomol. Hungarica* 23: 103-114.
- ❖ Martínez C. T. 2013. Estudio y purificación de peroxidasas implicadas en la lignificación de plantas basales. *Universidade da Coruña.* 227 p.p.
- ❖ Martínez-Tellez M. A. and Lafuente M. T. 1997. Effect of high temperature conditioning of ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150: 674-678.
- ❖ Maté M. J, Zamocky M, Nyquirí L. M, Herzog C, Alzari P. M, Betzel C, Koller F y Fita I (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 286:135-149.
- ❖ Monk L. S., Fagerstedt K. V., Crawford R. M. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as antioxidant enzymes in physiological stress. *Physiol Plant* 76: 456-459.
- ❖ 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.

- ❖ Murshudov G. N, Grebenko A. I, Brannigan J. A, Anston A. A, Barynin V. V, Dodson G. G, Dauter Z, Wilson K. S y Melik-Adamyanyan W. R. (2002). The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Cryst D58*:1972-1082.
- ❖ Osbourn A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- ❖ Ray J. 1901. Les maladies cryptogamiques des végétaux. *Revue Generale de Botanique* 13:145-151.
- ❖ Rivera H. R., Lozoya S. H., Colinas L. M. T. 2007. Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amoniolyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia*. 4:479-489.
- ❖ Riveros A. A. S., 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas* 61: 4-11.
- ❖ 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.
- ❖ Robledo E. E. M. Actividad enzimática de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) por infección natural de *Phytophthora infestans* Mont. De Bary. Tesis de maestría. Protección vegetal. Chapingo, Mex. 2009. 68 p.p.
- ❖ Robledo E. M. N., Lozoya S. H., Colinas L. M. T. 2012. Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) por fungicidas. *Asociación Interciencia*. 9: 689-695.
- ❖ Ross A. 1966. Systemic effects of local lesion formation. In: Beemster. ABR, Dykstra J.(eds.). *Viruses of plants*. Amsterdam, North. p. 127-150. Salisbury F. B. y Ross C W. 1994. *Fisiología vegetal*. Grupo editorial Iberoamericana. México, D. F. 759 p.
- ❖ Saniewski M. 1995. Metyl jasmonate in relation to ethylene production and other physiological processes in selected horticultural crops. *Acta Horticulturae* 394: 85-98.
- ❖ Sistema de Información Agropecuaria de Consulta, Anuario Estadístico de la producción agrícola (SIACON). Base de datos 2012. México D.F.

- ❖ Trujillo A., Navia O., Gandarillas A., Fernández E., Northcote E. 2001. Utilización de un activador de resistencia en estrategias de control químico del tizón de la papa (*Phytophthora infestans*) en los Andes. Febrero 13-16, 2001, Cochabamba, Bolivia. P. 5.
- ❖ Vand der Plank J. E. 1968. Disease resistance in plants. New York, Academic Press. 206 p.
- ❖ Vidhyasekaran P. 1988. Physiology of disease resistance in plants. Vol. II CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. P.128.
- ❖ Wang J. C., Zhang P. Y., Liu S. H y Chen K. S. 2009. A novel *Burdockfructooligosaccharide* induces changes in the production of salicylates, activates defence enzymes and induces systemic acquired resistance to *Colletotrichum orbiculare* in Cucumber seedlings. Journal of Phytopathology. 4: 201-207.
- ❖ Welinder K. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr Opin Struct Biol 2: 388-393.
- ❖ White R. F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99, 410-412.

## 10. APÉNDICE

### Apéndice 1

**Cuadro 1. Diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos para fenoles totales (prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ )**

| Tratamientos             | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 | Muestreo 5 |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                          | Media      | Media      | Media      | Media      | Media      |
| <b>Metalaxil-m DC</b>    | 0.4093 D   | 0.4520 BC  | 0.6253 A   | 0.3883 AB  | 0.3623 AB  |
| <b>Metalaxil-m MD</b>    | 0.4013 D   | 0.5360 AB  | 0.5000 BCD | 0.4453 AB  | 0.3763 AB  |
| <b>Fosetil-AI DC</b>     | 0.4040 D   | 0.4930 ABC | 0.4347 D   | 0.5053 AB  | 0.3867 AB  |
| <b>Fosetil-AIMD</b>      | 0.4530 C   | 0.5120 ABC | 0.6270 A   | 0.3523 B   | 0.4607 B   |
| <b>Mandipropamida DC</b> | 0.3996 D   | 0.5223 AB  | 0.5670 AB  | 0.3643 AB  | 0.3713 AB  |
| <b>Mandipropamida MD</b> | 0.4003 D   | 0.4280 C   | 0.4397 CD  | 0.4227 AB  | 0.4047 AB  |
| <b>Fluoxastrobin DC</b>  | 0.5020 A   | 0.4590 BC  | 0.4743 BCD | 0.5220 A   | 0.5343 A   |
| <b>Fluoxastrobin MD</b>  | 0.4820 B   | 0.5790 A   | 0.5103 BCD | 0.3970 AB  | 0.4453 AB  |
| <b>Testigo</b>           | 0.4726 B   | 0.5790 A   | 0.5327 ABC | 0.4603 AB  | 0.4022 AB  |

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey,  $\alpha=0.05$ . **MD**: media dosis, **DC**: dosis completa.

**Cuadro 2. Diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos para enzima superóxido dismutasa (SOD) (prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ )**

| Tratamientos             | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 | Muestreo 5 |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                          | Media      | Media      | Media      | Media      | Media      |
| <b>Metalaxil-m DC</b>    | 10.256 F   | 42.420 C   | 38.370 C   | 43.060 A   | 4.836 D    |
| <b>Metalaxil-m MD</b>    | 22.044 B   | 94.580 A   | 46.710 BC  | 28.134 BCD | 36.343 BC  |
| <b>Fosetil-AI DC</b>     | 19.855 C   | 46.710 C   | 84.060 A   | 14.191 BCD | 30.952 A   |
| <b>Fosetil-AI MD</b>     | 15.402 D   | 31.420 C   | 60.400 ABC | 23.370 BC  | 15.703 C   |
| <b>Mandipropamida DC</b> | 22.673 B   | 50.130 BC  | 74.290 ABC | 25.400 BC  | 27.009 AB  |
| <b>Mandipropamida MD</b> | 19.312 C   | 91.520 AB  | 77.530 AB  | 13.643 CD  | 13.622 CD  |
| <b>Fluoxastrobin DC</b>  | 12.849 E   | 35.070 C   | 50.190 ABC | 7.812 D    | 8.727 CD   |
| <b>Fluoxastrobin MD</b>  | 25.136 A   | 92.680 A   | 84.370 A   | 28.134 B   | 36.343 A   |
| <b>Testigo</b>           | 14.230 ED  | 93.400 A   | 41.440 C   | 17.034 BCD | 11.895 CD  |

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey,  $\alpha=0.05$ . **MD**: media dosis, **DC**: dosis completa.

**Cuadro 3. Diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos para enzima peroxidasa (POX) (prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ )**

| Tratamientos             | Muestreo 1 | Muestreo 2  | Muestreo 3  | Muestreo 4  | Muestreo 5  |
|--------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                          | Media      | Media       | Media       | Media       | Media       |
| <b>Metalaxil-m DC</b>    | 6869.300 B | 8888.400 AB | 8291.600 C  | 5068.900 C  | 6022.200 C  |
| <b>Metalaxil-m MD</b>    | 6828.400 B | 6624.000 EF | 9343.700 B  | 5575.700 BC | 6151.600 BC |
| <b>Fosetil-AI DC</b>     | 8214.200 A | 9219.800 A  | 9961.900 A  | 4344.800 D  | 4946.000 D  |
| <b>Fosetil-AI MD</b>     | 5582.400 C | 5804.300 G  | 9792.000 AB | 5555.700 BC | 5893.600 C  |
| <b>Mandipropamida DC</b> | 7002.700 B | 8866.600 AB | 7884.500 C  | 5766.100 B  | 6846.300 A  |
| <b>Mandipropamida MD</b> | 6629.300 B | 7977.300 CD | 7869.000 C  | 6675.900 A  | 3146.800 E  |
| <b>Fluoxastrobin DC</b>  | 3204.900 D | 6270.500 FG | 9291.300 B  | 5089.800 C  | 6448.200 B  |

|                         |            |             |             |             |            |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>Fluoxastrobin MD</b> | 2836.400 D | 7288.900 DE | 7721.500 CD | 5248.000 BC | 4985.300 D |
| <b>Testigo</b>          | 5362.200 C | 8342.100 BC | 7254.500 D  | 3333.100 E  | 953.100 F  |

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey,  $\alpha=0.05$ . MD: media dosis, DC: dosis completa.

**Cuadro 4. Diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos para enzima catalasa (CAT) (prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ ).**

| Tratamientos             | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 | Muestreo 5 |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                          | Media      | Media      | Media      | Media      | Media      |
| <b>Metalaxil-m DC</b>    | 15459 CD   | 21755 ABC  | 22204.9 DC | 14130 BC   | 16037 AB   |
| <b>Metalaxil-m MD</b>    | 14205 D    | 16757 C    | 26350.7 AB | 15016 BC   | 7046 CD    |
| <b>Fosetil-AI DC</b>     | 25273 B    | 23280 AB   | 27143.4 AB | 11625 DC   | 15048 B    |
| <b>Fosetil-AI MD</b>     | 22368 BC   | 27343 A    | 29511.8 A  | 9034 D     | 6353 CD    |
| <b>Mandipropamida DC</b> | 26170 B    | 22169 ABC  | 21080 D    | 16557 AB   | 19240 A    |
| <b>Mandipropamida MD</b> | 21886 BC   | 21712 ABC  | 20362.3 D  | 19124 A    | 6353 D     |
| <b>Fluoxastrobin DC</b>  | 17464 CD   | 17931 BC   | 25410.6 BC | 14301 BC   | 15291 B    |
| <b>Fluoxastrobin MD</b>  | 19686 BCD  | 19965 BC   | 21512.6 D  | 16380 AB   | 6375 CD    |
| <b>Testigo</b>           | 41310 A    | 22796 ABC  | 19456.2 D  | 10133 D    | 8175 C     |

Medias con letras similares dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Tukey,  $\alpha=0.05$ . MD: media dosis, DC: dosis completa.

**Cuadro 5. Modo de acción de los fungicidas utilizados (Reunión de Agricultura Protegida, 2008).**

| Fungicida                   | Grupo químico              | Modo de acción   |
|-----------------------------|----------------------------|--|
| Metalaxil-m (Ridomil Gold®) | Fenilamidas: acilalaninas  | Síntesis de ácidos nucleicos   |
| Fosetil-AI (Aliette®)       | Fosfonatos: etilfosfonatos | Estimula producción de fitoalexinas  |
| Mandipropamida (Revus®)     | Mandelamidas               | Inhibición de la síntesis de la celulosa de la pared celular, actuando a nivel de la proteína PiCesA3 celulosa sintetasa |
| Fluoxastrobin (Vigold®)     | Dihidrodioxazinas          | Inhibidores de la respiración  |

**Cuadro 6. Mecanismo de acción de fungicidas no específicos contra Oomicetos (Robledo, 2012).**

| Fungicida                 | Grupo químico                                | Mecanismo de acción                             |
|---------------------------|--|---|
| Azoxystrobin              | Estrobirulinas (Metoxiacrilatos)             | Afecta respiración                              |
| Fosetil-AI (Aliette®)     | Fosfonatos: etilfosfonatos                   | Estimula producción de fitoalexinas             |
| Boscalid + Pyraclostrobin | Anilidas + (Estrobirulinas) Metoxicarbamatos | Inhibe respiración celular + Afecta respiración |
| Pyraclostrobin            | Dihidrodioxazinas                            | Inhibe respiración celular                      |

## Apéndice 2.

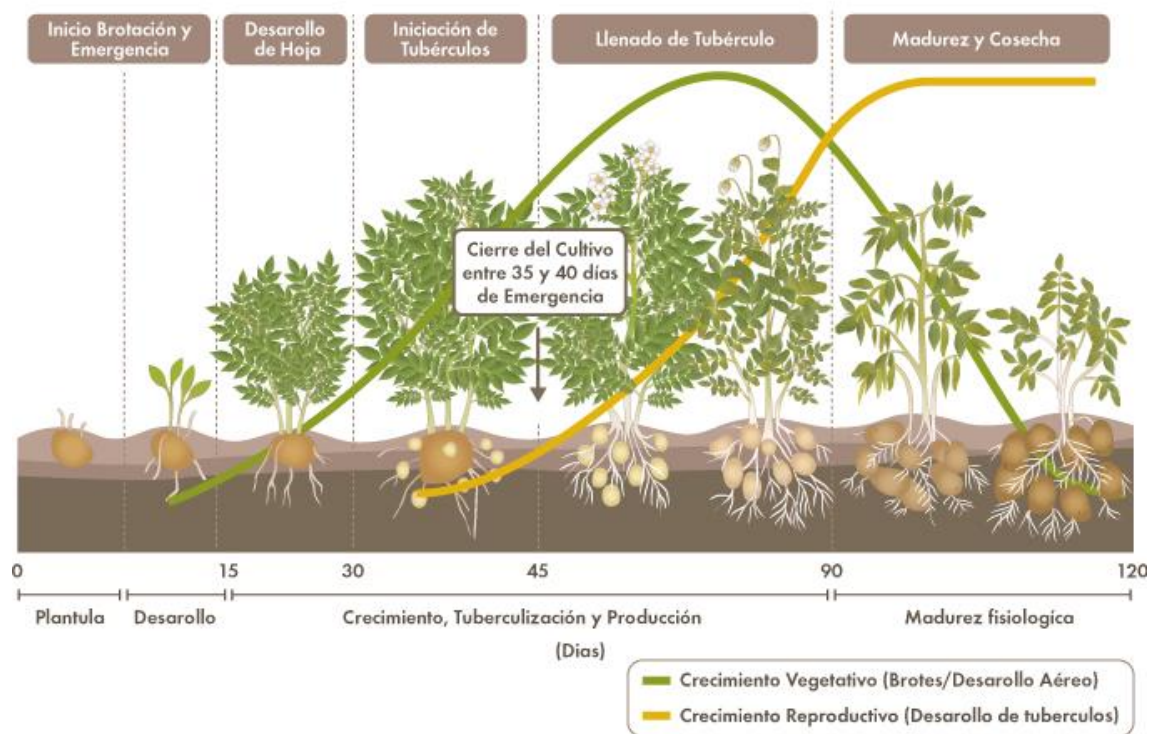


Figura 1. Desarrollo fenológico del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Tomado de <http://www.sqm.com/es-es/productos/nutricionvegetaldeespecialidad/cultivos/papa.aspx>)