

ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DE ESPECIES DE *Solanum* CONTRA

Phytophthora infestans (Mont., de Bary)

Héctor Lozoya Saldaña, Aída Juárez Cruz, María Teresa Colinas León y John Bamberg

RESUMEN

La resistencia de especies silvestres de *Solanum* a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es multigénica. Para cuantificar algunas respuestas enzimáticas al ataque del patógeno, tres especies silvestres resistentes y una cultivada, susceptible, de *Solanum*, se expusieron a la infección natural por *P. infestans* en el Valle de Toluca, México. No se presentó la enfermedad en las especies silvestres (*Solanum microdontum* Bitt, *S. demissum* Buk. y *S. pinnatisectum* Dun.). En la primera se obtuvieron correlaciones significativas ($P = \alpha 0,05$) entre fenoles totales (FEN) y fenilalanina-amonioliasa (PAL) ($r = 0,93$); peroxidasa (POX) y superóxido dismutasa (SOD) ($r = 0,97$); y PAL/POX ($r = 0,79$). En *S. demissum* las correlaciones con significancia estadística fueron

entre FEN/PAL ($r = 0,94$) y POX/SOD ($r = 0,88$). En *S. pinnatisectum* hubo significancia entre FEN/PAL ($r = 0,81$), POX/SOD ($r = 0,89$) y FEN/POX ($r = 0,95$). Para *S. tuberosum* L., susceptible, la enfermedad no permitió que la planta completara su ciclo. La actividad enzimática decreció en términos absolutos y fue menor que en las silvestres. No obstante, en *S. tuberosum* hubo correlaciones significativas entre FEN/PAL ($r = 0,97$), POX/SOD ($r = 0,93$) y FEN/POX ($r = 0,93$). En las especies resistentes, la actividad de las enzimas y de los fenoles totales se incrementó a medida que el patógeno se establecía, no así en la susceptible. Se corrobora la poligenia de defensa de las especies silvestres incluidas en el presente estudio contra el oomiceto.

Introducción

El tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum* L.), causado por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, presenta una gran variabilidad genética en el Valle de Toluca, México (Grünwald *et al.*, 2001), aceptándose éste como su lugar de origen (Goodwin *et al.*, 1994; Goodwin, 1996). También se considera como el segundo centro de diversificación de especies de *Solanum*, después de Perú, Bolivia y Chile (Hawkes, 1994; Spooner *et al.*, 2004). Al coincidir hospedero-patógeno en tiempo y espacio en la naturaleza, conviven en equilibrio para que ambos sobrevivan. La planta debe resistir el ataque del microorganismo. Esto ha sido demostrado durante décadas en especies silvestres de *Solanum* contra el oomiceto (Niederhaser and Mills, 1953; Flores-Crespo, 1959; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998). En ambientes naturales,

los mecanismos de defensa corresponden a resistencia horizontal o poligénica, por la gran variabilidad de genotipos del patógeno que se han aislado de las limitadas lesiones foliares (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006). El presente estudio tuvo como objetivo cuantificar algunas activaciones enzimáticas involucradas en la resistencia genética del hospedante contra la infección natural del patógeno.

Materiales y Métodos

Durante el verano de 2006 se sembraron 20 individuos de cada una de las especies silvestres resistentes a *P. infestans*, *Solanum microdontum* Bitt, *S. demissum* Buk. y *S. pinnatisectum* Dun., así como la especie cultivada, susceptible, *S. tuberosum* L., en el conjunto SEDAGRO, ICAMEX-PICTIPAPA-INIFAP, en Metepec, México, bajo un régimen de secano, sin aplicación de plaguicidas,

para propiciar así la infección natural por *P. infestans*. Se hicieron lecturas semanales de infección foliar de acuerdo a la escala de Henfling (1987) a partir de un mes posterior a la siembra, una semana después de la emergencia. Para el análisis de presencia y actividad enzimática, se hicieron tres muestreos de 30g de hojas al azar de cada población (18/08, 30/08 y 27/09/2006), en función de las etapas fenológicas de inicio de floración, plena floración e inicio de la senectud (las especies incluidas en este estudio son de ciclo tardío).

Polvo de acetona

Se denomina polvo de acetona al tejido que queda después de su maceración con acetona, para analizar la actividad enzimática. Una muestra de 30g de tejido foliar, macerada en una licuadora doméstica con 50ml de acetona al 100% a 4°C, fue

filtrada al vacío, separándose el sobrenadante del tejido, y la pasta de tejido deshidratada a temperatura ambiente, es el polvo de acetona. Este procedimiento se repitió cuatro veces por muestra. De requerirse, puede almacenarse a -4°C el sobrenadante y el tejido hasta correr los ensayos enzimáticos (Alia Tejacal *et al.*, 2002).

Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales (FEN), a 0,03ml del sobrenadante se agregaron 16,97ml de agua desionizada, 1ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, y 2ml de carbonato de sodio 20%. Una vez agitado, se reposó en oscuridad por 2h, seguido por la lectura de absorbancia a 760nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy), y se cuantificó en función de una curva patrón de ácido tánico, expresándose como mg de fenoles totales por g de peso

PALABRAS CLAVE / Enzimas / FEN / PAL / *Phytophthora infestans* / POX / SOD / *Solanum* /

Recibido: 15/05/2010. Modificado: 21/06/2010. Aceptado: 22/06/2010.

Héctor Lozoya Saldaña. Doctor en Fitotecnia y de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, UACH, México. Profesor, UACH, México. Dirección: Km. 38.5, carretera fede-

ral México-Texcoco, Chapingo, Estado de México 56230, México. e-mail: picti87@gmail.com
Aída Juárez Cruz. Maestra en Ciencias y estudiante graduada, UACH, México.

María Teresa Colinas León. Doctora en Fitotecnia, UACH, México. Profesora-Investigadora, UACH, México.

John Bamberg. Plant Geneticist. Profesor, University of Wisconsin, EEUU.

ENZYMATIC ACTIVATION OF *Solanum* SPECIES AGAINST *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary)

Héctor Lozoya Saldaña, Aída Juárez Cruz, María Teresa Colinas León and John Bamberg

SUMMARY

Resistance of wild *Solanum* species to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary is multigenic. In order to quantify some enzymatic reactions to the attack of the pathogen, three resistant and one cultivated, susceptible, *Solanum* species, were exposed to natural infection by *P. infestans* in the Toluca valley, México. The disease did not establish in the wild species (*Solanum microdontum* Bitt., *S. demissum* Buk., and *S. pinnatisectum* Dun.). In the first one, significant correlations were obtained ($P=\alpha 0.05$) between total phenols (FEN) and phenyl alanine ammonium lyase (PAL) ($r=0.93$); peroxidase (POX) and superoxyde dismutase (SOD; $r=0.97$); and PAL/POX ($r=0.79$). In *S. demissum* the correlations with statistical significance were between FEN/PAL ($r=0.94$) and

POX/SOD ($r=0.88$). In *S. pinnatisectum* significance was found between FEN/PAL ($r=0.81$), POX/SOD ($r=0.89$), and FEN/POX ($r=0.95$). For *S. tuberosum* L., the susceptible species, the disease did not allow the plant to complete its cycle. The enzymatic activity in this species decreased in absolute terms, and was lower than that of the wild ones. However, in *S. tuberosum* there were significant correlations between FEN/PAL ($r=0.97$), POX/SOD ($r=0.93$), and FEN/POX ($r=0.93$). Enzymatic activity and total phenols increased in the resistant species along with the pathogen establishment, not so in the susceptible. The polygenic defense of the wild species included in this study against the oomycete is confirmed.

ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA DE ESPÉCIES DE *Solanum* CONTRA *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary)

Héctor Lozoya Saldaña, Aída Juárez Cruz, María Teresa Colinas León e John Bamberg

RESUMO

A resistência de espécies silvestres de *Solanum* a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary é multigênica. Para quantificar algumas respostas enzimáticas ao ataque do patógeno, três espécies silvestres resistentes e uma cultivada, suscetível, de *Solanum*, foram expostos a infecção natural por *P. infestans* no Valle de Toluca, México. A enfermidade não se apresentou nas espécies silvestres (*Solanum microdontum* Bitt., *S. demissum* Buk. e *S. pinnatisectum* Dun.). Na primeira foram obtidas correlações significativas ($P=\alpha 0.05$) entre fenóis totais (FEN) e fenilalanina amonio liasa (PAL) ($r=0,93$); peroxidasa (POX) e superóxido dismutase (SOD) ($r=0,97$); e PAL/POX ($r=0,79$). Em *S. demissum* as correlações com significância estatística foram entre FEN/PAL ($r=$

0,94) e POX/SOD ($r=0,88$). Em *S. pinnatisectum* houve significância entre FEN/PAL ($r=0,81$), POX/SOD ($r=0,89$) e FEN/POX ($r=0,95$). Para *S. tuberosum* L., suscetível, a enfermidade não permitiu que a planta completara seu ciclo. A atividade enzimática decresceu em termos absolutos e foi menor que nas silvestres. Todavia, em *S. tuberosum* houve correlações significativas entre FEN/PAL ($r=0,97$), POX/SOD ($r=0,93$) e FEN/POX ($r=0,93$). Nas espécies resistentes, a atividade das enzimas e dos fenóis totais se incrementaram na medida em que o patógeno era estabelecido, não sendo assim nas suscetíveis. Se corrobora a poligenia de defesa das espécies silvestres incluídas no presente estudo contra o oomiceto.

fresco de follaje (Waterman y Mole, 1994).

Fenilalanina amonio-liasa EC4.3.1.5

La fenilalanina amonio-liasa EC4.3.1.5 (PAL) fue extraída con el método de Martínez-Téllez y Lafuente (1997) y el ensayo enzimático se hizo de acuerdo a Arz y Grambow (1995). A 0,1g de polvo de acetona, en frío, se le agregó 1,8ml de borato de sodio 0,1M; pH 8,8; a este amortiguador se le añade al momento 20mM de 1% B-mercaptoetanol y polivinilpirrolidona (PVP). Se homogenizó y se agitó durante 20min a 4°C. Se filtró con manta de cielo, y el filtrado se centrifugó a 12500rpm a 4°C por 20min. Al sobrenadante se

le precipitó la enzima agregando 0,46g·ml⁻¹ de sulfato de amonio, agitando durante 30min a 4°C. Después se volvió a centrifugar por 20min a 12500rpm a 4°C. Se recuperó el precipitado y se le disolvió en 5ml de amortiguador de acetato de amonio 0,1M a pH 7,7 con 20mM de mercaptoetanol y 1% PVP.

Para el ensayo enzimático del tejido en estudio, se mezclaron 1,8ml del amortiguador de acetato de amonio con 0,9ml del extracto (precipitado mas amortiguador) preincubado a 40°C durante 5min, con 0,3ml·l⁻¹ fenilalanina 100mM, y tanto de inmediato como 2h después se midió la absorbancia a 290nm. Simultáneamente se efectuó un ensayo similar para el blanco, como referencia, carente de fenilalanina.

Se midió el cambio de absorbancia en las 2h a 290nm a 40°C, se restó la lectura del blanco al ensayo de las muestras y se reportó como U/g de peso fresco, donde U es el incremento de absorbancia a 290nm por hora.

Peroxidasa EC1.11.1.7

La peroxidada EC1.11.1.7 (POX) fue determinada mediante el método descrito por Alia-Tejacal *et al.* (2002). A 0,1g de polvo de acetona se agregó 5ml de Tris-HCl 0,1M; pH 7,1 con 1% PVP en frío. Se homogenizó y se centrifugó 20min a 12500rpm a 4°C. A 0,05ml del sobrenadante se le agregaron 2,6ml de amortiguador Tris-HCl; pH 7,1; 0,25ml guayacol 0,1M y 0,1ml peróxido de hidrógeno 0,25%.

Se evaluó el cambio de absorbancia a 30, 60, 120 y 180s, a 470nm. La actividad enzimática se reportó como U/g peso fresco, donde U es unidad de actividad enzimática, equivalente a la formación de 1mmol·min⁻¹ de tetraguayacol.

Superóxido dismutasa 1.15.1.1

Para determinar la superóxido dismutasa 1.15.1.1 (SOD), se mezcló 0,025g de polvo de acetona con 5ml de amortiguador fosfato 0,01M; pH 7,8. Se homogenizó por 50s en frío. Posteriormente se centrifugó a 12500g por 20min a 4°C y se dejó que el sobrenadante alcanzara la temperatura ambiente en total oscuridad. En un tubo se colocaron 3ml de amortigua-

dor fosfatos 0,01M a pH 7,8 con EDTA 0,01M, metionina 30mg·ml⁻¹, nitro azul de tetrazolio (NBT) 1,4mg·ml⁻¹ y Triton X 0,01ml junto con 0,5ml de sobrenadante y se agitó. Posteriormente se le agregaron 0,03ml de riboflavina y se agitó vigorosamente de nuevo. Para el testigo se siguió el mismo procedimiento, pero sin agregar riboflavina. Se incubaron en cuarto oscuro con luz fluorescente (4 lámparas Osram, Red Slimline 75W, luz de día) durante 7min y después se midió el cambio de absorbancia a 560nm. La actividad enzimática se reportó en unidades internacionales por gramo de peso fresco (U/g pf), donde cada unidad es igual a la cantidad del sobrenadante que fotoinhibe la formación de 50% de azul de nitro tetrazolio-formazan (Beyer y Fridovich, 1987).

Análisis de resultados

Para el análisis de correlación se tomaron en cuenta todas las lecturas de los ensayos enzimáticos. De cada muestra del polvo de acetona y de la acetona sobrenadante, se hicieron cuatro repeticiones y tres lecturas por repetición (12 lecturas por muestra). Además, se tomaron dos muestreos para *S. tuberosum* y tres para las otras especies durante el ciclo (24 y 36 datos por enzima, respectivamente). Los resultados fueron analizados con los programas NCSS (number crunching statistical system) y Excel, para correlación y para graficar el comportamiento de las diferentes variables evaluadas.

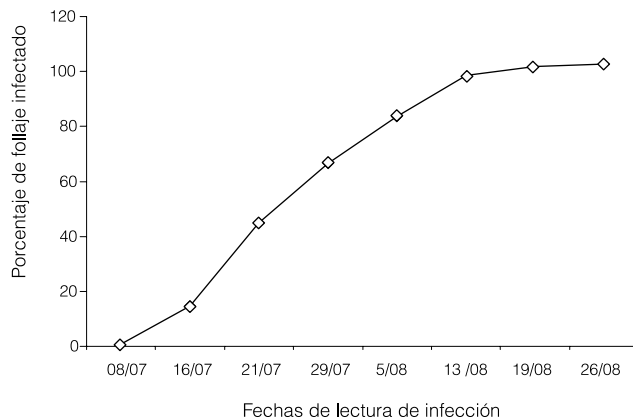


Figura 1. Curva de progreso de la infección foliar por *Phytophthora infestans* en *Solanum tuberosum*.

Resultados y Discusión

Porcentaje de infección

S. tuberosum fue la única especie que resultó infectada. Por lo tanto, solo a ella se le tomó lectura de progreso de la enfermedad (Figura 1). Las otras especies resultaron inmunes (Figura 2). Este comportamiento se ha presentado como una constante en múltiples ensayos en el valle de Toluca (Niederhauser, 1991; Lozoya Saldaña y Hernández Vilchis, 2001; Grünwald y Flier, 2005). Cabe aclarar que para la fecha del tercer muestreo (27/09/2006)

S. tuberosum había muerto, de manera que solo se obtuvo tejido procesable de esta especie en los dos primeros muestreos.

Fenoles totales

Se observó un incremento en los fenoles totales a medida que se establecía

P. infestans. Algunos compuestos fenólicos tóxicos para los patógenos se generan en mayor cantidad cuando ha ocurrido la infección, inhibiendo la producción de enzimas fúngicas y la actividad enzimática del patógeno, como respuesta de defensa de la planta (Vidhyasekaran, 1997; Agrios, 2001). Este aumento en los fenoles totales en estas especies silvestres de *Solanum*, se debe a que se activa una defensa pasiva contra el oomiceto, acumulándose los fenoles por la ruta de los fenilpropanoides y síntesis de la PAL (Basha *et al.*, 2006). *S. tuberosum*, por el contrario,

tuvo un decremento en los fenoles totales debido a su susceptibilidad al oomiceto, al grado de no sobrevivir para el tercer muestreo (Figura 3a).

Fenilalanina amonio-liasa

Las especies silvestres de *Solanum* tuvieron incremento en la actividad de esta enzima a medida que avanzaba el ciclo de cultivo (*S. pinna-tisectum*, *S. demissum* y *S. microdontum*, mientras que la especie cultivada, *S. tuberosum*, susceptible, inicialmente presentó la mayor actividad, pero la disminuyó con el avance de la enfermedad hacia su segundo y último muestreo (Figura 3b). La relación inversa enfermedad-PAL ha sido señalada con anterioridad, en el sentido de que, en función de la resistencia genética del hospedante, la actividad de esta enzima aumenta cuando la planta resistente es sometida a diferentes situaciones de agobio (comúnmente designada como stress) y ataque de patógenos (Bobby, 1989; Vidhayasekaran, 1997). De la misma manera, Azcon Bieto y Talon (1993) aseguran que se debe a que los genes responsables de la síntesis de la enzima pueden responder a la presencia de inductores biológicos, aunque por otro lado, Jones (1984) asegura que la PAL se presenta en todos los estadios del crecimiento, lo que explicaría porqué la variedad susceptible tuvo mayor actividad que las resistentes en el primer muestreo.

Peroxidasa

Hubo aumento en la actividad de esta enzima en el lapso del muestreo en las tres especies silvestres incluidas en este estudio (Figura 3c). En función de la resistencia genética del hospedante, el incremento en la actividad de la POX favorece

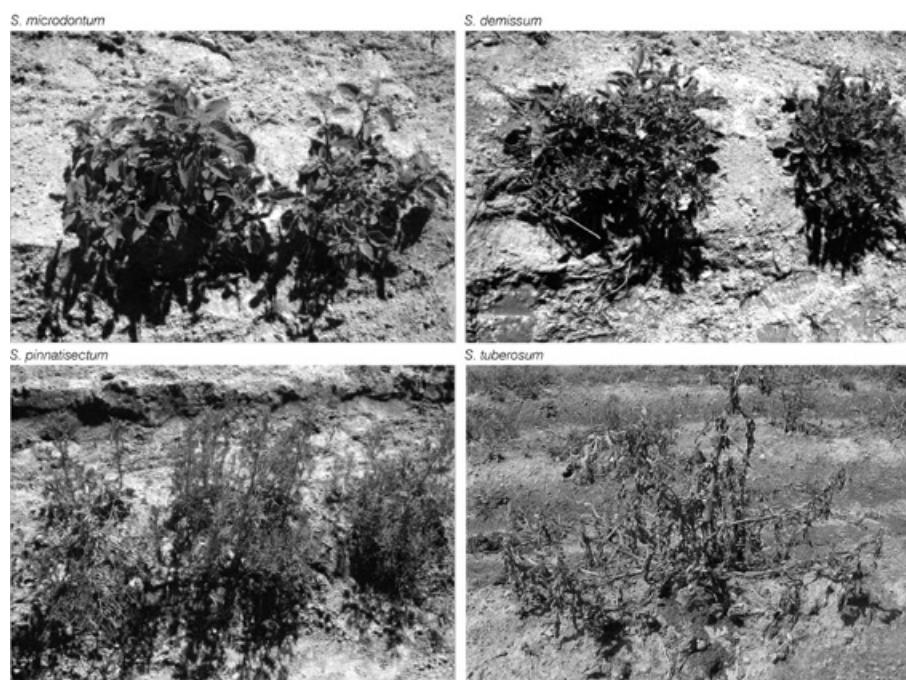


Figura 2. Aspecto general de las plantas al final del ciclo de crecimiento.

la lignificación de la pared celular y follaje para que el patógeno no se establezca en la planta (Goodman *et al.*, 1986). En el caso de *S. tuberosum*, sucedió lo mismo con la POX que con las otras enzimas, pues a medida que las condiciones ambientales favorecían el establecimiento de la enfermedad fue disminuyendo la actividad enzimática, propio de un material susceptible. El inicio del proceso oxidativo por la peroxidasa desencadena los mecanismos de defensa de la planta, donde el O_2^- es generado por diversas rutas y el NADH/NADP es oxidado a NAD/NAD⁺ en presencia de peroxidasa. El O_2^- sufre una reducción, hay una reacción específica en la membrana por fosforilación de NAD(P)H-oxidasa que cataliza la reducción del oxígeno molecular, dando como resultado la muerte del patógeno (Mehdy, 1994).

Superoxido dismutasa

Al igual que con las enzimas anteriores, las especies silvestres de *Solanum* mostraron un incremento en la actividad de la SOD a medida que avanzó el ciclo, como una de las reacciones de defensa propias de la resistencia natural de estas especies (*S. pinnatisectum*, *S. demissum*, *S. microdontum*). No así con *S. tuberosum*, que disminuyó su actividad, como reflejo de su susceptibilidad a *P. infestans* (Figura 3d). Esta enzima proporciona protección a las células contra la toxicidad del O_2^- , transformándolo en H_2O_2 y actuando directamente contra el patógeno (Vidhyasekaran, 1997). Gutiérrez (2006) señala que con la presencia del patógeno se presenta la expresión de genes de avirulencia en la interacción planta-patógeno y la expresión del grupo de genes Hrp o genes de hipersensibilidad. Vidhyasekaran (1997) también menciona que la POX en combinación con la SOD minimizan la acción tóxica de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas

en inglés). En el caso de *S. tuberosum* se presentó lo contrario, pues disminuyó la actividad de la SOD en el segundo muestreo respecto al primero, como debería ser considerando su condición de especie susceptible, que murió posteriormente por el ataque del patógeno, sin dar oportunidad de obtener un tercer muestreo.

La supervivencia de los organismos depende de las interacciones de sus genomas con el medio ambiente. Así, las especies silvestres de *Solanum* mostraron un incremento en la actividad de PAL, POX, SOD y fenoles totales a medida que avanzaba el ciclo y la enfermedad. Sobresale *S. demissum*, con mayor actividad de las enzimas. A esta especie se le reconoce ampliamente por su resistencia a *P. infestans*, e históricamente es la más utilizada desde principios del siglo XX en los programas internacionales de mejoramiento (Ligarreto, 2001; Fry, 2008). *S. pinnatisectum* presentó una actividad similar a *S. demissum*, especie resistente aunque no es muy utilizada en mejoramiento, y finalmente *S. microdontum*, que aunque tuvo menor actividad que las anteriores, no presentó infección. Por otro lado, la especie cultivada y susceptible *S. tuberosum*, fue resistente al ataque de algunas razas que se presentaron al principio del ciclo (Calderón, 2008) pero decayó posteriormente cuando se presentaron otras razas, y en este proceso se observó

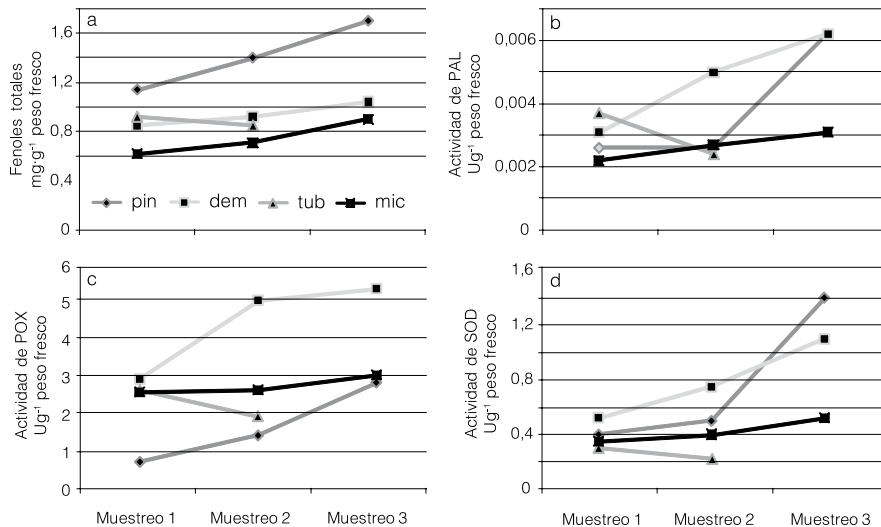


Figura 3. Actividad enzimática. a: concentración de fenoles totales, b: actividad de la PAL, c: actividad de la POX, y d: actividad de la SOD. Pin: *Solanum pinnatisectum*, dem: *S. demissum*, tub: *S. tuberosum*, y mic: *S. microdontum*. Las fechas de muestreo fueron 1: 18/08/2006, 2: 30/08/2006, y 3: 27/09/2006.

una declinación en la actividad enzimática estudiada.

Correlaciones

Como se aprecia en la Tabla I, en el análisis de correlación de las lecturas de los ensayos enzimáticos se detectó significación estadística ($P = \alpha \leq 0,05$) entre

las correlaciones FEN/PAL ($r = 0,934098$), PAL/POX ($r = 0,786853$) y POX/SOD ($r = 0,974500$) para el caso de *S. microdontum*. Por otro lado las correlaciones entre FEN/POX, FEN/SOD y PAL/SOD fueron altas pero no significativas. Para *S. demissum* las correlaciones fueron significativas para FEN/PAL, FEN/

TABLA I
COEFICIENTES DE CORRELACIÓN Y SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LAS VARIABLES, PARA IDENTIFICAR ACCIÓN/PRESENCIA CONJUNTA O INDEPENDIENTE DE ESTOS METABOLITOS ENTRE LAS ESPECIES DE *Solanum* ESTUDIADAS

	FEN	PAL	POX	SOD
<i>S. microdontum</i>				
FEN	1,00	0,934098 *	0,881640 NS	0,769386 NS
PAL		1,00	0,786853 *	0,786294 NS
POX			1,00	0,974500 *
SOD				1,00
<i>S. demissum</i>				
FEN	1,00	0,945933 *	0,766914 *	0,865232 NS
PAL		1,00	0,753345 NS	0,741276 NS
POX			1,00	0,876633 *
SOD				1,00
<i>S. pinnatisectum</i>				
FEN	1,00	0,810134 *	0,95548 *	0,769386 NS
PAL		1,00	0,850427 NS	0,825007 NS
POX			1,00	0,889704 *
SOD				1,00
<i>S. tuberosum</i>				
FEN	1,00	0,971282 *	0,933001 *	0,682466 NS
PAL		1,00	0,792314 NS	0,63383 NS
POX			1,00	0,929529 *
SOD				1,00

Nivel de significación: $P = \alpha \leq 0,05$, NS: no significativo, FEN: fenoles totales, PAL: fenilalanina amonio-liasa, POX: peroxidada, y SOD: superóxido dismutasa.

POX y POX/SOD, mientras que entre FEN/SOD, PAL/POX y PAL/SOD resultaron no significativas. En el caso de *S. pinnatisectum* las correlaciones fueron significativas entre FEN/PAL, POX/SOD y FEN/POX, mientras que FEN/SOD, PAL/POX y PAL/SOD no lo fueron. Finalmente, en *S. tuberosum* las correlaciones tuvieron significación estadística en los casos de FEN/PAL, POX/SOD y FEN/POX, no siendo así para FEN/SOD, PAL/POX y PAL/SOD. Estas correlaciones en esta especie susceptible implican acción combinada entre enzimas, pero no oportuna ni en cantidades suficientes para contrarrestar el ataque del patógeno, pues en función de la severidad de la enfermedad tendrá mayor peso la gráfica de la Figura 1 que las correlaciones obtenidas en este caso.

Se observó una correlación directa y significativa para todas las especies entre la actividad de PAL y la concentración de fenoles totales (PAL/FEN), esto debido a que la PAL regularmente exhibe mayor actividad o síntesis de novo en tejidos enfermos o en genotipos resistentes, y es precursora de la mayoría de los compuestos fenólicos (Dixon y Harrison, 1991). De igual manera, hubo una alta correlación POX/SOD en todas las especies. La SOD, que cataliza la dismutación del O_2^- y lo convierte en, se encuentra en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias de las plantas. Las peroxidasas utilizan ese H_2O_2 en las reacciones de lignificación y junto con la ascorbato peroxidasa lo eliminan, utilizando ácido ascórbico para convertirlo en agua durante los procesos de defensa de la planta ante un patógeno (García *et al.*, 2004).

En el caso de la alta correlación entre fenoles totales y peroxidasas (FEN/POX) para *S. demissum*, *S. pinnatisectum* y *S. tuberosum*, se explica porque la peroxidasa oxida los compuestos fenólicos y 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 (Agrios, 2001). Aún cuando FEN/POX no fue significativa en *S. microdontum*, su valor fue alto ($r=0.88$). Algo parecido sucedió con las correlaciones para FEN/SOD y FEN/PAL, que resultaron positivas pero no significativas en todas las especies.

Algunas evidencias sobre la multigenicidad de la resistencia de especies silvestres de *Solanum* ante el ataque de *P. infestans* han sido indirectas, por la diversidad de biotipos del patógeno al que enfrentan exitosamente dichas especies (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006). Esta resistencia se ha localizado para *S. bulbocastanum*, otra especie silvestre igualmente resistente a las aquí incluidas, en diversos grupos de genes ubicados en los cromosomas 4 (Tae-Ho *et al.*, 2005) y 8 (Naess *et al.*, 2000), así como para *S. tuberosum* en el cromosoma 5, asociado a la madurez del follaje (Visker *et al.*, 2003). Un mayor acercamiento al metabolismo indica que para variedades resistentes o susceptibles en *S. tuberosum*, la susceptibilidad sigue un patrón del ácido shikimico-fenilpropanoide, al detectarse metabolitos fenólicos y ácido benzóico, como precursores del ácido salicílico, que a su vez dispara la síntesis de compuestos fenólicos, lo que explica la presencia de fenoles totales en la especie susceptible incluida en este trabajo. Los genotipos resistentes, por otro lado, siguen la ruta del ácido mevalónico-metileritritol, al detectarse ácido heptadecanóico, posible derivado del ácido linolénico, que a su vez es precursor del ácido jasmónico, que conduce a la síntesis de terpenos que favorecen la resistencia sistémica inducida propia de genes de protección y de defensa, cuyos productos,

entre otros, son precisamente las enzimas incluidas en el presente estudio (Abu-Nada *et al.*, 2007). La ausencia de síntomas visibles también pudo deberse a reacciones de hipersensibilidad, que en las especies de *Solanum* conducen a la necrosis de las células infectadas, que al morir impiden el establecimiento del patógeno, y cuya efectividad difiere en función del grado de resistencia genética de los clones o especies (Vleeshouwers *et al.*, 2000).

Conclusiones

Las especies incluidas en este estudio activaron mecanismos enzimáticos de defensa contra el patógeno de manera poligénica y simultánea (fenoles totales, fenilalanina amonio-liasa, peroxidasas y superóxido dismutasa), pero aquellas resistentes respondieron antes y con mayor intensidad que la especie susceptible. Se comprueba la hipótesis de la resistencia horizontal, de campo o poligénica, generada a raíz de la gran variabilidad de genotipos de *Phytophthora infestans* que han sido identificados en el valle de Toluca, México.

REFERENCIAS

- Abu-Nada Y, Kushalappa AC, Marshal WD, Prasher SO (2007) Metabolic profiling horizontal resistance in potato leaves (cvs. Caesar and Ac Novachip) against *Phytophthora infestans*. En Nikolau BJ, Wurtele ES (Eds.) *Concepts in Plant Metabolomics*. Springer. Secaucus, NJ, EEUU. 157 pp.
- Agrios GN (2001) *Fitopatología*. Limusa. México. 838 pp.
- Alia-Tejagal I, Martínez-Damián MT, Soto-Hernández MR (2002) Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) durante poscosecha. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 8: 263-271.
- Arz CM, Grambow JH (1995) Elicitor and suppressor effects on phospholipase C in isolated plasma membranes correlate with alterations in phenylalanine ammonialyase activity of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 146: 64-70.
- Azcon Bieto J, Talon M (1993) *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 581 pp.
- Basha SA, Sarma BK, Singh DP, Annapurna K, Singh UP (2006) Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiol.* 51: 463-468.
- Beyer FW, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bobey R, Baggiolini M (1989) *La Defensa de las Plantas Cultivadas. Tratado Práctico de Fitopatología y Zoología Agrícola*. 2ª ed. Omega. Barcelona, España. 897 pp.
- Calderón-Marcial ND (2008) *Algunas Reacciones de Defensa en Diferenciales de Solanum spp. para Dazas de Phytophthora infestans (Mont) D. Bary*. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 48 pp.
- Dixon RA, Harrison MJ (1991) Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Genet.* 28: 166-234.
- Flores-Crespo R (1969) *Taxonomía, Distribución y Potencial de los Solanum Tuberosos Silvestres de México*. Folleto Misceláneo N° 20. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México. 33 pp.
- Fry WE (2008) *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol.* 9: 385-402.
- García PE, Arreola CA, Castro ME (2004) Oxígeno, herramienta para fabricar defensas bioquímicas en la planta del chile. *Cienc. Des.* (Jul-Ago 2004) 5 pp. www.conacyt.mx/comunicacion/revista/177/articulos/pdf/oxigeno.pdf
- Goodman NR, Kirán Z, Wood KR (1986) *The Biochemistry and Physiology of the Plant Disease*. University of Missouri Press. Columbia, MI, EEUU. 268 pp.
- Goodwin SB (1996) Origin and ecology of *Phytophthora infestans*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14: 143-147.
- Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE (1994) Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 11591-11595.
- Grünwald NJ, Flier WG (2005) The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 171-190.

- Grünwald NJ, Flier WG, Sturbaum AK, Garay SE, Van de Bosch TBM, Smart CD, Matuszak JM, Lozoya-Saldaña H, Turkensteen LJ, Fry WE (2001) Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central México. *Phytopathology* 91: 882-890.
- Gutiérrez GC (2006) Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Rev. Chapingo Ser. Cs. Forest. Amb.* 12: 25-30.
- Hawkes JG (1994) Origins of cultivated potatoes and species relationship. En Bradshaw JE, Mackay GR (Eds.) *Potato Genetics*. CABI. Dundee, RU. 576 pp.
- Henfling JW (1987) *El tizón tardío de la papa* *Phytophthora infestans*. Boletín de Información Técnica N° 4. 2ª ed. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 25 pp.
- Jones DH (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry* 23: 1349-1359.
- Ligarreto MGA (2001) Los Recursos Genéticos: Un acervo importante para el mejoramiento de la producción de Papa. *Innov. Cambio Tecnol.* 2: 12-17.
- Lozoya-Saldaña H, Hernández-Vilchis A (2001) Compuestos registrados y de la sección 18 para el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) en papa en Toluca, México. *Agrociencia* 35: 451-458.
- Lozoya-Saldaña H, Perales-Rosas D, Fernández-Pavía SP, Grünwald NJ (2006) Characterization of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. II. Subpopulations obtained from wild *Solanum* species. *Agrociencia* 40: 325-333.
- Martínez-Téllez MA, Lafuente MT (1997) Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol-oxidase activities in flavedo of chilled 'Fortune' mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150: 674-678.
- Medhy MC (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- Naess SK, Bradeen JM, Wielgus SM, Haberlach GT, McGrath JM, Helgeson JP (2000) Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101: 697-704.
- Niederhauser JS (1991) *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. En Lucas JA, Shattock RC, Shaw DS, Cooke LR (Eds.) *Phytophthora*. Cambridge University Press. Cambridge, RU. pp 25-45.
- Niederhauser JS, Mills WR (1953) Resistance of *Solanum* species to *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology* 43: 456-457.
- Ruiz de Galarreta JL, Carrasco A, Salazar A, Barrena I, Iturrutxa E, Marquínez R, Gorburu FJ, Ritter E (1998) Wild *Solanum* species as resistance sources against different pathogens of potato. *Potato Res.* 41: 57-68.
- Spooner DM, van den Berg RG, Rodríguez A, Bamberg J, Hijmans RJ, Lara-Cabrera SI (2004) *Wild Potatoes (Solanum section petota; Solanaceae) of North and Central America*. Systematic Botany Monographs Vol. 68. Ann Arbor, MI, EEUU. 209 pp.
- Tae-Ho P, Gros J, Sikkema A, Vleeshouwers V, Muskens M, Allefs S, Jacobsen E, Visser R, Van der Vossen E (2005) The blight resistance locus Rpi-bib3 from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight R gene cluster on chromosome 4 of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 722-729.
- Vidhyasekaran P (1997) *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. Molecular Biology and Host Defense Mechanisms*. Dekker. Nueva York, EEUU. 553 pp.
- Visker MHP, WKeizer LCP, van Eck HJ, Jacobsen E, Colon LT, Struik PC (2003) Can the QTL for late blight resistance on potato chromosome 5 be attributed to foliage maturity type? *Theor. Appl. Genet.* 106: 317-325.
- Vleeshouwers VG, van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210: 853-864.
- Waterman PG, Mole S (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell. Oxford, RU. 238 pp.