

INDUCCIÓN DE DEFENSA EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CONTRA *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY POR FUNGICIDAS

Martha Nayeli Robledo-Esqueda, Héctor Lozoya-Saldaña y María Teresa Colinas-León

RESUMEN

Los nuevos fungicidas ahora también contemplan las reacciones de defensa del hospedante. Mediante aspersiones con fungicidas al tubérculo-semilla y al follaje de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha, susceptible al tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary), en el valle de Toluca, México, se estudió el estímulo de reacciones de defensa de la planta sobre la infección natural de *P. infestans*. No hubo protección al follaje al aplicar solo a la siembra, pues la infección foliar fue similar a la del testigo sin fungicidas. Con aspersión adicional al follaje 30 días después de la siembra, la infección final fue de 60-80% respecto al testigo. Hubo similitud entre tratamientos en los patrones de síntesis y/o actividad de los metabolitos estudiados, con altas correlaciones entre ellos. A medida que avanzó la infección incrementaron fenoles (FEN),

peroxidasa (POX) y fenilalanina-amonioliasa (PAL), con inconsistencias en la acción de la POX y la superóxido dismutasa (SOD) al aplicarse los productos a semilla y follaje, y con descenso de la actividad de SOD cuando fueron aplicados solo a la semilla. Destaca el estímulo inducido por Fosetil-Al en la actividad de SOD y PAL cuando se aplicó a semilla y follaje, aunque las correlaciones se limitaron a SOD con infección y POX, mientras que la PAL actuó independientemente. Se concluye que los productos estudiados estimulan respuestas inespecíficas de la planta, pero no lo suficiente para proteger contra patógenos sobre los que no actúan directamente (excepto Fosetil-Al), y que las estrechas correlaciones entre los metabolitos evidencian el carácter poligénico de las respuestas de defensa de la planta.

Introducción

La resistencia de la planta a sus patógenos depende a menudo de si ésta puede reconocerlo al inicio de la infección. Las plantas contrarrestan el ataque con barreras físicas o por medio de reacciones bioquímicas, que producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo (Agrios, 2001). La resistencia de este tipo ocurre cuando una o más de estas sustancias alcanzan una concentración suficiente para inhibir el avance de la infección (Goodman *et al.*, 1986). Entre las alteraciones metabólicas inducidas por los patógenos en el hospedante se incluye la síntesis de metabolitos secundarios y enzimas, que

dan lugar al desarrollo de la resistencia en torno a los sitios de infección. La respuesta defensiva de la papa involucra procesos como la acumulación de fenoles (FEN), peroxidases (POX) y la fenilalanina amonioliasa (PAL) (Cornide *et al.*, 1994). Los compuestos fenólicos, aunque suelen estar presentes también en las plantas no infectadas, aumentan su concentración de forma considerable tras la entrada del patógeno y su síntesis después de la entrada de éste es mucho mayor en variedades resistentes que en las susceptibles (Dai, *et al.*, 1995). La PAL por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor en los tejidos enfermos, y es clave en la producción de la molé-

cula básica precursora en la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, como las fitoalexinas y la lignina (Agrios, 2001). Las POX pueden considerarse como enzimas bifuncionales, ya que oxidan varios sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, pero también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo, Passardi *et al.*, 2005). Su implicación en procesos fisiológicos y de desarrollo vegetal puede detectarse desde la germinación hasta la senescencia, incluyendo la defensa frente a patógenos (Kristensen *et al.*, 1999), suberización (Bernards *et al.*, 1999), oxidación de fenoles y especialmente en la lignificación (La-

grimini, 1991). Respecto a la superóxido-dismutasa (SOD), numerosos estudios demuestran que el agobio ambiental tiene un importante efecto sobre la expresión y actividad SOD en plantas (Bowler *et al.*, 1994). Condiciones adversas como la sequía, bajas temperaturas y ataque por patógenos se han correlacionado con la actividad de la SOD como un antioxidante de defensa, así como en células expuestas al O₂ (Monk *et al.*, 1989).

Las nuevas generaciones de fungicidas no solo se enfocan al estudio de su efecto directo sobre el patógeno, sino también sobre el hospedante, pues en ausencia de la enfermedad se ha observado un estímulo en el vigor de la planta (Lozoya-Saldaña y Bautista,

PALABRAS CLAVE / Fungicidas / Metabolitos Vegetales / *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum* / Tizón Tardío /

Recibido: 12/02/2011. Modificado: 03/09/2012. Aceptado: 10/09/2012.

Martha Nayeli Robledo-Esqueda. Maestra en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México. Doctorante, Colegio de Posgraduados, México.

Héctor Lozoya-Saldaña. Doctor en Fitotecnia y Parasitología Agrícola, 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

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

DEFENSE INDUCTION IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) AGAINST *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY BY FUNGICIDES

Martha Nayeli Robledo-Esqueda, Héctor Lozoya-Saldaña and María Teresa Colinas-León

SUMMARY

New fungicides now also consider the host defense reactions. Potato seed-tuber and foliage (*Solanum tuberosum* L.), cv. Alpha, susceptible to late blight (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary), were sprayed with fungicides in the Toluca Valley, Mexico, in order to study the host defense reaction stimuli over natural infection by *P. infestans*. No foliage protection was observed when only seed-treated, for the infection was similar to that in the control without fungicides. On the other hand, final infection reached 60-80% of that of the control when foliage was additionally sprayed once, 30 days after planting. There were similar metabolite synthesis and/or activity patterns after treatments, with high correlations between variables. As infection levels increased, so it did phenols (FEN), peroxidase

(POX) and phenylalanine ammoniolyase (PAL), with inconsistencies in POX and superoxide dismutase (SOD) activity when the products were sprayed to seed and foliage, and with a decrease in SOD activity when only seed-treated. Fosetyl-Al stimuli on SOD and PAL were outstanding when seed and foliage were sprayed, although correlations were limited to SOD-infection and SOD-POX, while PAL effect was independent. It is concluded that the products included in this study do stimulate non-specific plant reactions, but not enough as to protect against pathogens for which such products do not work directly (except Fosetyl-Al). Also, the close correlations among metabolites are an evidence of the polygenic character of the plant defense reactions.

INDUÇÃO DE DEFESA EM BATATA (*Solanum tuberosum* L.) CONTRA *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY POR FUNGICIDAS

Martha Nayeli Robledo-Esqueda, Héctor Lozoya-Saldaña e María Teresa Colinas-León

RESUMO

Os novos fungicidas agora também contemplam as reações de defesa do hospedeiro. Mediante aspersões com fungicidas ao tubérculo-semente e a folhagem de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha, suscetível à requeima da batata (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary), no vale de Toluca, México, se estudou o estímulo de reações de defesa da planta sobre a infecção natural de *P. infestans*. Não houve proteção à folhagem ao aplicar somente na plantação, pois a infecção foliar foi similar à da testemunha sem fungicidas. Com aspersão adicional na folhagem 30 dias depois da plantação, a infecção final foi de 60-80% em relação à testemunha. Houve semelhanças entre tratamentos nos padrões de sínteses e/ou atividade dos metabólitos estudados, com altas correlações entre eles. Na medida em que avançou a infecção, incrementaram-se fenóis (FEN), peroxidase (POX) e

fenilalanina-amônio liasa (PAL), com inconsistências na ação da POX e a superóxido dismutase (SOD) ao aplicar-se os produtos na semente e folhagem, e com descenso da atividade de SOD quando foram aplicados somente na semente. Destaca o estímulo induzido por Fosetyl-Al na atividade de SOD e PAL quando se aplicou na semente e folhagem, ainda que as correlações se limitassem a SOD com infecção e POX, enquanto que a PAL atuou independentemente. Conclui-se que os produtos estudados estimulam respostas inespecíficas da planta, mas não o suficiente para proteger contra patógenos sobre os que não atuam diretamente (exceto Fosetyl-Al), e que as estreitas correlações entre os metabólitos evidenciam o carácter poligênico das respostas de defesa da planta.

2005; Lozoya-Saldaña y Hernández-Vilchis, 2001). La síntesis de sustancias por la planta de papa (*Solanum tuberosum* L.) que son tóxicas para el patógeno está relacionada cuantitativamente con el nivel de resistencia genética y el uso de inductores químicos (Ardila e Higuera, 2005), El Azoxystrobin pertenece al grupo de las estrobilurinas, como fungicida preventivo, antiesporulante sistémico, contra cerca de 30 hongos (www.laguasata.com/azoxystrobin.htm); la patente clama mayor período de vida posco-

secha de follaje de lechuga y mejores propiedades organolépticas (www.faqs.org/patents/app/20090143231). Pyraclostrobin es otra estrobilurina contra hongos del suelo, que en combinación con Boscalid (anilida) y/o Epoxiconazole, hacen una combinación de sistemicidad local, altamente efectiva también contra patógenos de follaje como royas y cenicillas (www.laguasata.com/pyraclostrobin+%20epoxiconazole.htm). Además, se reporta mayor actividad enzimática, síntesis de fenoles y ligninas y

aumento en la biomasa en soya (www.scielo.br/rss.php?pid=0100-5405&lang=en). Fosetyl-Al es un alcoil fosfonato con sistemicidad bidireccional en la planta, contra oomicetos de raíz y follaje, que estimula la defensa natural del hospedante (www.cheminova.com.mx/es/fungicidas/fosthor_wdg/). Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo estudiar el efecto residual estimulante de defensa que algunos de estos productos pudieran ejercer en plantas de papa contra tizón tardío (*Phytophthora infes-*

tans). Se aclara que es un estudio de efecto residual en el hospedante, pues con excepción de Fosetyl-Al, que es de sistemicidad bidireccional y es específico contra oomicetos, los otros productos son solamente translaminares y no tienen efecto fungicida contra *P. infestans*.

Materiales y Métodos

Durante el verano del 2007, bajo condiciones de temporal, se sembraron unidades experimentales de papa (*Solanum tuberosum*

TABLA I
TRATAMIENTOS APLICADOS

Tratamiento*	Fungicida	Dosis
1	Azoxystrobin 50%	5g·l ⁻¹
2	Boscalid + Pyraclostrobin	12,5g·l ⁻¹
3	Pyraclostrobin	1ml·l ⁻¹
4	Fosetil - Al	6 g·l ⁻¹
5	Testigo	0
6	Azoxystrobin 50%	5g·l ⁻¹
7	Boscalid + Pyraclostrobin	12,5g·l ⁻¹
8	Pyraclostrobin	1ml·l ⁻¹
9	Fosetil - Al	6g·l ⁻¹
10	Testigo	0

Del 1 al 4: aspersión a la semilla en la siembra y al follaje un mes después, con el mismo producto y dosis; del 6 al 9: aplicación solamente a la semilla en la siembra.

L.) en surcos de 5m de largo con 15 plantas cada uno y cuatro repeticiones, con la variedad susceptible Alpha, expuesta a la infección natural por *Phytophthora infestans* Mont. De Bary, en el Campo Agrícola Experimental PICTIPAPA-ICAMEX-INIFAP de Metepec, valle de Toluca, México. Los primeros tratamientos (1 a 4) consistieron de aspersión a la semilla al momento de la siembra y una aspersión al follaje un mes después, con el mismo producto y dosis (plantas de 15 a 20cm de altura). Los tratamientos 6 a 9 incluyeron una sola aplicación a la semilla, en la siembra. Los testigos, sin aplicación de fungicidas, fueron los tratamientos 5 y 10 (Tabla I).

De la quinta a la novena semana después de la siembra, se hicieron lecturas semanales de tizón tardío de acuerdo a la escala de Henfling (1987). En las mismas fechas se hicieron los muestreos de follaje para el análisis enzimático. Para los tratamientos a la semilla y al follaje, se tomaron cinco lecturas e igual número de muestreos. Los tratamientos solo a la semilla sobrevivieron únicamente lo suficiente para tres muestreos. Las variables evaluadas fueron porcentaje de infección de la enfermedad, presencia de fenoles y la actividad enzimática de peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX), fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5, PAL) y superóxido

dismutasa (1.15.1.1, SOD). No se consideró el rendimiento de tubérculo porque no se obtuvo cosecha en ningún tratamiento. El análisis de varianza se hizo bajo un diseño completamente al azar en programas SAS (Statistical Analysis System) y Excel, con comparación de medias mediante la prueba de Tuckey ($P=\alpha\leq 0,05$). Además, con el fin de detectar comportamientos paralelos o de la influencia de un metabolito sobre otro, o sus interacciones, se corrieron pruebas de correlación entre las variables incluidas en este estudio.

Las determinaciones en el laboratorio se hicieron a partir de polvo de acetona, el cual se obtuvo al macerar en licuadora doméstica 20g de hojas en 50ml de acetona 100% a 4°C, filtrado al vacío y separación de la acetona.

Fenoles

A 0,03ml del sobrenadante de acetona se le agregaron 16,97ml de agua desionizada con 1ml de Folin-Ciocalteu y 2ml de carbonato de sodio 20%. Se agitó y dejó reposar por 2h en la oscuridad para posteriormente leer la absorbancia a 760nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy, EEUU). La cuantificación se realizó mediante una curva patrón de ácido tánico y la concentración de fenoles totales se registró como mg·g⁻¹ p.f. (Waterman y Mole 1994)

Peroxidasa (EC.1.11.1.7, POX)

La actividad de POX se determinó mediante el procedimiento descrito por Alia-Tejacal *et al.* (2002) y Flurkey y Jen (1978). La enzima se extrajo a partir de 0,1g de polvo de acetona disuelto en 5ml de Tris-HCl frío, pH 7,1, conteniendo 1% de polivinilpirrolidona. Se homogeneizó por 50s y se centrifugó por 20min a 12500rpm y 4°C. Para los ensayos se tomaron 0,05ml del sobrenadante y se mezclaron con 2,6ml de amortiguador Tris-HCl pH 7,1; 0,25ml de guayacol 0,1M; y 0,1ml de peróxido de hidrógeno 0,25%, para hacer un total de 3ml. El cambio de absorbancia a 470nm se evaluó a los 30, 60, 120 y 180s y la actividad enzimática se expresó como U·g⁻¹ p.f. (unidades de actividad enzimática por g de peso fresco, considerando una unidad como igual a la formación de 1mmol·min⁻¹ de tetraguayacol).

Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)

Se homogeneizó 0,1g de polvo de acetona con 5ml de borato de sodio 0,1 M (pH 8,8) frío y β-mercaptoetanol 20mM durante 50s, seguido por agitación continua por 20min en baño de hielo (4°C), filtrado con manta de cielo y centrifugado a 12500rpm durante 20min a 4°C, conservando el sobrenadante, del cual se precipitó la enzima con 0,46g de sulfato de amonio por ml?? de sobrenadante y agitación por 30min a 4°C. Se centrifugó nuevamente por 20min a 12500rpm a 4°C, conservándose el precipitado, que se re-disolvió con 5ml de borato de sodio 0,1M pH 8,8. (Arz y Grambow, 1995). Para el ensayo enzimático se tomaron 0,9ml de este extracto y se mezclaron con 1,8ml de borato de sodio 0,1M pH 8,8; se pre-incubó a 40°C por 5min, agregándosele después 0,3ml de fe-

nilalanina 100mM, midiéndose la absorbancia a 290nm. Simultáneamente, se efectuó otro ensayo de la mezcla de 0,9ml del extracto con 2,1ml de borato de sodio 0,1 M pH 8,8 con mediciones de la absorbancia a la misma longitud de onda (290nm) en 2h, manteniendo la muestra en baño a 40°C. La actividad enzimática se reportó como U·g⁻¹ p.f., en donde U=Δ (unidades de absorbancia a 290nm·h⁻¹) (Martínez-Tellez y Lafuente, 1997).

Superóxido dismutasa (1.15.1.1. SOD)

El método utilizado fue el descrito por Beyer y Fridovich (1987). En frío, a 0,1g de polvo de acetona se agregaron 5ml de solución amortiguadora de fosfato 0,01M pH 7,8. Se homogeneizó y se centrifugó a 16500rpm durante 20min a 4°C. A temperatura ambiente y en ausencia de luz, se colocaron 3ml de solución amortiguadora EDTA-metionina, NBT y triton, en tubo de ensayo de rosca. Se agregaron 0,5ml del sobrenadante, se agitó, se adicionó rivoftlavina, se volvió a agitar, se iluminó durante 7min con lámpara de luz fluorescente y se leyeron en el espectrofotómetro a 560nm.

Resultados y Discusión

Infección foliar

A pesar de que los productos no son específicos contra el tizón (excepto Fosetil-Al), se observó disminución en la infección cuando se aplicaron a la semilla y al follaje, siendo, en la quinta semana, Pyraclostrobin, Fosetil-Al y Azoxystrobin, estadísticamente iguales entre sí (73, 70, y 76% de infección foliar final, Tukey, $P=\alpha\leq 0,05$), mientras que el testigo (100% de infección) y el tratamiento con Boscalid-Pyraclostrobin (58% de infección) resultaron significativamente diferentes ($R^2=0,973686$; Tabla II, Figura 1a).

TABLA II
INFECCIÓN FOLIAR FINAL POR *P. infestans*

	S-F		S	
	%I	*	%I	*
Azoxystrobin	76	b	94	b
Boscalid-Pyraclostrobin	58	c	94	b
Pyraclostrobin	73	b	97	b
Fosetil-Al	70	b	97	b
Testigo	100	a	100	a

S-F: aplicación a la semilla y al follaje, S: aplicación solo a la semilla, %I: porcentaje de infección, *: tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P=\alpha\leq 0,05$).

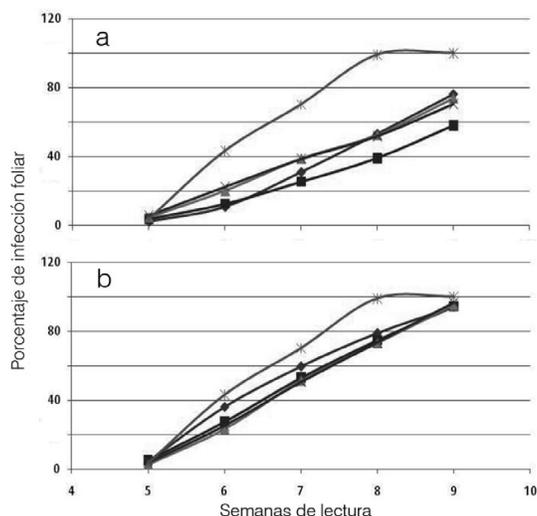


Figura 1. Avance de la infección foliar. a: aplicación a la semilla y al follaje, b: aplicación solo a la semilla en la siembra. Azoxystrobin \blacklozenge , Boscalid-Pyraclostrobin \blacksquare , Pyraclostrobin \blacktriangle , Fosetil-Al \times , Testigo \ast .

Destaca un ligero efecto residual de los tratamientos cuando solo se hicieron en la siembra, con porcentajes de infección para Azoxystrobin de 94,5%, Boscalid + Pyraclostrobin de 94,3%, Pyraclostrobin y Fosetil-Al de 96,7%, diferentes significativamente al testigo (100%) pero iguales entre sí ($R^2=0,986014$; Tabla II, Figura 1b). No obstante, al final las plantas sucumbieron a la enfermedad, aunque después del testigo.

Fenoles totales

Cuando los tratamientos se hicieron a la siembra y al follaje, hubo una disminución de fenoles en todos los tratamientos de la quinta a la octava semana después de la siembra. La aspersión al follaje no estimuló la acumulación

de fenoles en este período. Posteriormente se registró un repunte en su contenido (Figura 2a), paralelo al aumento del porcentaje de infección (Figura 1a). Considerando el promedio de presencia y actividad de los productos a lo largo del ciclo, no se detectó diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Tabla III). En los tratamientos solo a la semilla el incremento de este metabolito fue constante (Figura 2b), con ligeras diferencias respecto al testigo al final. Aplicando únicamente Pyraclostrobin tanto a la semilla como al follaje, se indujo una síntesis de fenoles inferior al resto de los productos y al testigo, aunque, como ya se mencionó, sin diferencia con el resto de los tratamientos. Se reporta a este producto como lipo-

filico, que se acumula en las capas serosas de epidermis de la hoja, desplazándose a cortas distancias por vía translaminar (www.agrodigital.com/vitiv/noticias/lanzacabrio.htm), pero sin reportes sobre la baja fenolización detectada en nuestro estudio. Cuando se aplicó únicamente a la semilla, la presencia de fenoles fue lo suficientemente baja como para ser significativa-

cia cuando se aplica Pyraclostrobin contra patógenos del suelo no oomicetos (Lozoya-Saldaña y Bautista, 2005).

Peroxidasas (EC.1.11.1.7, POX)

Cuando las aplicaciones fueron tanto a la semilla como al follaje, disminuyó la actividad de esta enzima de la sexta a la séptima semana en

TABLA III
PROMEDIOS DE PRESENCIA/ACTIVIDAD DE LOS METABOLITOS POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS*

	Tratamiento	FEN **		POX **		PAL **		SOD **	
A semilla y follaje	Azoxystrobin	1,7810	a	1286,4	a	0,01988	b	9,162	b
	Boscalid-Pyr	1,9102	a	2438,2	a	0,01787	b	13,854	b
	Pyraclostrobin	1,6496	a	3212,2	a	0,03086	b	52,067	ab
	Fosetil-Al	1,827	a	2294,0	a	0,09321	a	101,59	a
	Testigo	1,6672	a	1733,1	a	0,02677	b	75,838	ab
Solo a semilla	Azoxystrobin	2,6796	a	3134,8	a	0,04134	a	97,559	a
	Boscalid-Pyr	2,0672	a	2662,2	a	0,03426	a	111,74	a
	Pyraclostrobin	0,7657	a	2393,6	a	0,03822	a	63,607	a
	Fosetil-Al	2,0364	a	2883,6	a	0,03537	a	129,28	a
	Testigo	2,4859	a	2279,6	a	0,03172	a	77,946	a

* Ver unidades de cuantificación en Materiales y Métodos.

**Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P=\alpha\leq 0,05$).

TABLA IV
CORRELACIONES CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA ENTRE TRATAMIENTOS ($\alpha=0,05$)

Fungicida	A semilla y follaje	Solo a semilla
Azoxystrobin	INF/SOD	INF/FEN, FEN/POX FEN/PAL, INF/POX INF/PAL, POX/PAL
Boscalid + PYR	INF/SOD, FEN/SOD POX/PAL	INF/FEN, FEN/POX INF/POX, FEN/PAL INF/PAL
Pyraclostrobin	Ninguna	INF/FEN FEN/POX POX/PAL INF/POX FEN/PAL INF/PAL
Fosetil-Al	INF/POX POX/SOD INF/SOD	INF/FEN FEN/POX INF/POX
Testigo	INF/PAL	INF/POX FEN/POX INF/FEN INF/PAL

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

mente diferente al resto (Tabla III). Esto pudiera indicar dos cosas; por un lado, Pyraclostrobin no estimuló reacciones de defensa que involucren fenoles, pero por otro, por lo mismo, tampoco la fenolización, razón por lo que a la cosecha se han observado tubérculos de mejor aparien-

todos los tratamientos, con incrementos posteriores incluyendo al testigo, excepto con Pyraclostrobin, pues aunque en cifras absolutas estimuló la mayor actividad de POX respecto al resto de los tratamientos, declinó al final (línea superior bimodal, Figura 2c). Esto ocasionó que, en prome-

dio de lecturas a lo largo del ciclo, este tratamiento resultara estadísticamente igual al resto, en la síntesis de estas enzimas (Tabla III), sin reflejarse estos tratamientos en el control de tizón, pues en general, éste patógeno terminó el ciclo cubriendo la mayor parte del follaje (Tabla II). La resistencia ocurre cuando una o mas fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno (Andreu, *et al.*, 2000). En este caso no fue suficiente la concentración para evitar que el patógeno siguiera desarrollándose. Es de notar que en estos tratamientos de semilla y follaje, Azoxistrobin estimuló la síntesis de POX aún menos que el testigo, aunque sin diferencia estadística entre ambos. Por otro lado, este producto fue el que mayormente estimuló la síntesis de dicha enzima cuando se aplicó una sola vez a la semilla, aunque con cifras similares estadísticamente a las obtenidas para Fosetil-Al y para el resto de los tratamientos con grados de infección foliar parecidos (94 y 97%, respectivamente, Tabla II).

Fenilalanina amonio-liasa (EC4.3.1.5 PAL)

La mayor actividad de esta enzima se registró para el tratamiento con el fungicida Fosetil-Al aplicado a la semilla y al follaje, alcanzando valores de $0,13279\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{p.f.}$ en la semana 6 y un promedio por todo el ciclo de $0,093\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{p.f.}$, superior estadísticamente al resto de los tratamientos (Tabla III) y contrastando estos, siempre menores al de Fosetil-Al (Tabla III, Figura 2e). Este contraste en la actividad enzimática de PAL no se refleja en la infección, que fue muy similar para todos los tratamientos (Figura 1a). Cuando la aspersión fue solo a la semilla, la inducción enzimática por Boscalid-Pyraclostrobin fue contrastante, pues indujo la menor actividad inicial respecto a los demás, pero presentó la mayor

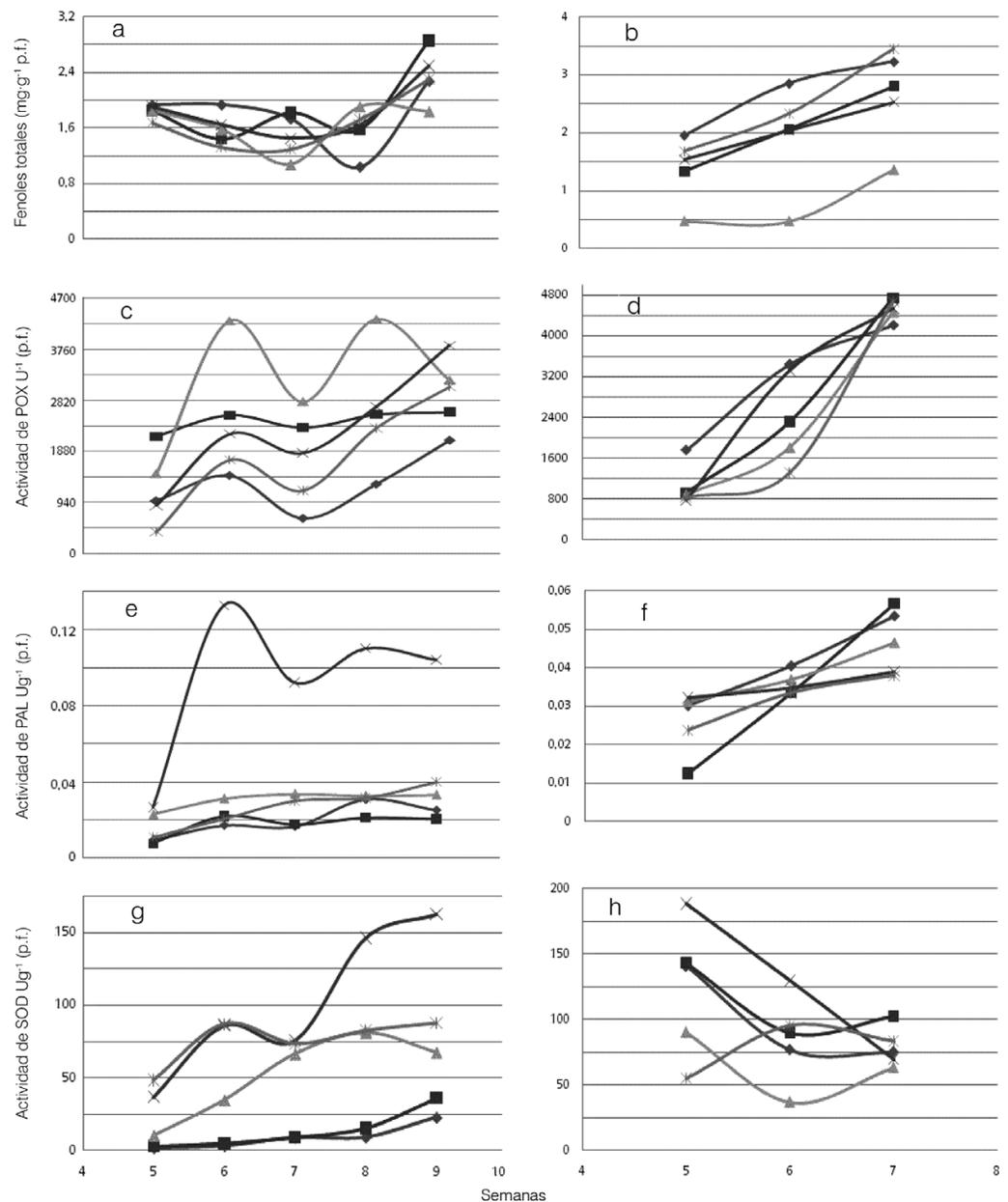


Figura 2. Presencia y acción enzimática por efecto de los tratamientos. a, b: fenoles totales; c,d: peroxidasa; e, f: fenilalanina amonio-liasa; g, h: superóxido-dismutasa. Azoxistrobin \blacklozenge , Boscalid-Pyraclostrobin \blacksquare , Pyraclostrobin \blacktriangle , Fosetil-Al \times , Testigo \circ . a, c, e y g, fueron tratamientos a la semilla y al follaje; b, d, f y h, fueron aspersiones solo a la semilla en la siembra.

respuesta posterior (Figura 2f), aunque, en promedio del ciclo, todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales (Tabla III) y nuevamente, esto no se evidenció en la infección foliar, parecida entre los tratamientos pero superior en el testigo, que alcanzó el 100% en la penúltima semana de lecturas (Figura 1b). Con excepción del Fosetil-Al, que fue superior estadísticamente al resto, no hubo diferencia significativa para los demás tratamientos, incluyendo al

testigo, cuando se aplicaron a la semilla y al follaje, lo que indica que cuando hubo eliminación del patógeno, aunque limitada, por efecto de las reacciones del hospedante inducidas por los fungicidas, la actividad PAL se mantuvo.

Superóxido dismutasa (1.15.1.1. SOD)

Cuando los tratamientos fueron a la semilla y al follaje, en el primer muestreo (a la quinta semana después de la

siembra), y aún sin infección foliar por tizón, solo se detectó actividad de la SOD en el tratamiento de Fosetil-Al y en el testigo, con ascenso significativo, junto con pyraclostrobin, en la siguiente semana. Por otro lado, Azoxistrobin y la combinación Boscalid-Pyraclostrobin, estimularon la actividad de SOD marginalmente. Al final del ciclo, a medida que avanzaba la infección, destaca la gran actividad de esta enzima, inducida particularmente por Fosetil-Al (Figura

ra 2g), seguida por el testigo y Pyraclostrobin. Estos tres tratamientos resultaron estadísticamente iguales entre sí, pero superiores y diferentes a los otros dos (Azoxystrobin y Boscalid-Pyraclostrobin, Tabla III). Cuando los tratamientos se hicieron solo a la semilla, también la presencia del Fosetil-Al fue la que estimuló más la expresión de SOD en el primer muestreo, siendo el testigo el que presentó la menor actividad (Figura 2h). Todos los tratamientos disminuyeron la acción de SOD a la siguiente semana, mientras que en el testigo se incrementó. Finalmente terminaron todos con actividades similares, y sus promedios no presentaron diferencias estadísticas significativas (Tabla III). La SOD cataliza el rompimiento del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, siendo una enzima importante de defensa antioxidante (Bowler *et al.*, 1994), pero esta acción no se efectuó porque la influencia de los agroquímicos se perdió al aplicarlos únicamente en la semilla al momento de la siembra, pero con una aplicación posterior si se estimuló la acción enzimática. Los productos incluidos en este estudio son de sistemicidad local (translaminares), excepto Fosetil-Al, que sí se desplaza bidireccionalmente en los tejidos.

Correlaciones

Las correlaciones estadísticas cuantifican e identifican las dependencias existentes entre variables. Esto es, determinan si las acciones por una de las variables influyen en los cambios de otra. De ser así, las variables están correlacionadas. En el presente estudio las correlaciones se calcularon mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0,05$. Cuando los productos se asperjaron tanto a la semilla como al follaje, hubo pocas correlaciones estadísticamente significativas, destacando Pyraclostrobin con ninguna, mientras que cuando se aplicaron solo a la semilla si se in-

dujeron interacciones entre todos los tratamientos, y en ambos tipos de aplicación de los agroquímicos (a semilla y follaje o solo a la semilla) la infección estuvo presente en la mayoría de las combinaciones (Tabla IV). Esto es, que a mayor infección por aplicación deficiente (solo a la semilla) se presentó más actividad conjunta entre variables. Así, en este grupo destacan seis correlaciones por aplicación de Azoxystrobin o de Pyraclostrobin, superando al testigo y al resto de los tratamientos.

Consideraciones generales

Actualmente el estudio sobre la acción de los nuevos fungicidas también se enfoca sobre su efecto en el hospedante, y es importante saber hasta que punto los productos estimulan las reacciones de defensa de la planta. Aquí se incluyeron tratamientos como únicos al tubérculo-semilla al momento de la siembra, para ver posible efecto residual de defensa inherente al hospedante pero estimulada por el tratamiento, o tratamiento a la semilla en la siembra y adicionalmente una sola vez al follaje un mes después de la siembra, a fin de identificar algún reforzamiento de defensa inducido en la planta con fungicidas que no son específicos contra oomicetos (excepto Fosetyl-Al), y cuantificar 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 y sin que los agroquímicos actuaran directamente sobre el patógeno. Así, cualquier inhibición de la infección se adjudicaría al hospedante, aunque por estímulo del producto. Al incluir dos testigos sin protección química, cuatro productos y dos tiempos de aplicación, se suman diez tratamientos (Tabla I), que al medirles cinco variables (INF, FEN, POX, PAL y SOD), el análisis de correlación por pares de éstas arroja un total de 20 posibles combi-

naciones por tratamiento, que hacen 100 correlaciones por tipo de aplicación, esto es, cuatro productos y un testigo solo a la semilla en la siembra (5×20) o a semilla y follaje, que con su testigo también hacen el mismo número de combinaciones (5×20). En la Tabla IV solo se incluyen las combinaciones a las que se identificaron significancias estadísticas. Se aprecian correlaciones únicamente a ocho pares cuando los tratamientos fueron a semilla y follaje, y a 24 combinaciones si la aplicación solo era a la semilla. El mensaje que dan estas cifras es que existe una mayor coordinación de síntesis y acción de las enzimas involucradas en la defensa de la planta cuando su situación es más adversa. Las similitudes de respuesta bioquímica en la mayoría de las combinaciones metabolito-agroquímico se respaldan con altas correlaciones obtenidas entre las variables, y aunque limitadas, se refleja la estrecha interacción o actividad conjunta entre los metabolitos cuantificados, con énfasis bajo situaciones de vulnerabilidad. Por el contrario, el estímulo atípico de Fosetyl-Al sobre SOD y PAL cuando se aplicó a la semilla y al follaje, se limitó a la correlación de la SOD con la infección y con POX, mientras que la PAL actuó de manera independiente, sin correlaciones significativas con las otras variables.

En el presente estudio no hubo protección posterior al follaje cuando la aplicación fue solo a la semilla durante la siembra, pues la infección foliar en los tratamientos fue similar a la del testigo sin fungicidas, pero con una aspersión adicional al follaje, la infección final fue de 60-80% con respecto al testigo (100%). En general, hubo similitud entre los patrones de síntesis y/o actividad de los metabolitos de defensa estimulados por los productos, sin diferencias estadísticas significativas al comparar las medias de todo el ciclo. Así, a medida que avanza la infección se detectaron incremen-

tos en FEN, POX y PAL, con irregularidades en la acción de POX y de SOD al aplicar-se los productos de la semilla y al follaje, y con descenso de la actividad de la SOD cuando los productos se aplicaron solo a la semilla. No obstante, destaca el estímulo inducido por Fosetyl-Al en la actividad de SOD y PAL cuando se aplico a la semilla y al follaje, superando significativamente el resto de los tratamientos. Es importante aclarar que los otros productos son localmente sistémicos o translaminares. Penetran pero no se desplazan en el tejido (Gómez, 2011). Por otro lado Fosetyl-Al es sistémico bidireccional y si actúa contra oomicetos, aunque su aplicación se hizo en un tiempo cuando el patógeno aun no estaba presente.

Conclusiones

Se concluye que los productos incluidos en el presente estudio estimulan respuestas comunes de defensa no-específica de la planta, pero no lo suficiente como para protección contra patógenos para los que dichos productos no actúan, y que las estrechas correlaciones entre los metabolitos manifiestan el carácter poligénico de las respuestas de defensa de la planta.

REFERENCIAS

- Agrios GN (2001) *Fitopatología*. 2ª ed. UTEHA. México. 973 pp.
- Alia-Tejacal I, Colinas-León MT, Martínez-Damián MT, Soto-Hernández MR (2002) Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota Jacq*) durante poscosecha. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 8: 263-271.
- Andrew A, Oliva C, Distel S, Daleo G (2000) Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 44: 1-9.
- Ardila H, Higuera B (2005) Inducción diferencial de polifenoloxidasas y 1,3glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus L*) durante la infección por *Fusarium oxysporum f. sp. di-*

- anthi* raza 2. *Acta Biol. Col.* 10: 65-78.
- Arz CM, Grambow JH (1995) Elicitor and suppressor effects on phospholipase C in isolated plasma membranes correlate with alterations in phenylalanine ammonia-lyase activity on wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 146: 64-70.
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL (1999) Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.* 121: 135-145.
- Beyer F, Fridovich W (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D (1994) Superoxide dismutase in plants. *Rev. Plant Sci.* 13: 199-218.
- Cornide M, Lima TH, Surli J (1994) *La Resistencia Genética de las Plantas Cultivadas*. Editorial Científico- Técnica. La Habana, Cuba. 194 pp.
- Dai GH, 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. Plant Pathol.* 101: 541-547.
- Flurkey WH, Jen JJ (1978) Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.* 43: 828-831.
- Gómez GA (2011) *Azoxystrobin: Espectro, Desempeño, y Recomendaciones de Uso en el Control de Enfermedades Fungosas*. www.florintegral.com.co/articulo.php?opcion=009
- Goodman NR, Kiraly Z, Wood KR (1986) *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press. Columbia, MI, EEUU. 433 pp.
- Henfling JW (1987) *El Tizón Tardío de la Papa* Phytophthora infestans. Boletín Informativo Técnico N° 4. 2ª ed. Centro Internacional de la Papa. Perú. 25 pp.
- Kristensen BK, Bloch H, Rasmussen SK (1999) Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiol* 120: 501-512.
- Lagrimini LM (1991) Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96: 577-583.
- Lozoya-Saldaña H, Bautista C (2005) Pyraclostrobin-Boscalid, ¿son solo fungicidas o también inductores de resistencia en la planta? *Mem. XXXII Congr. Nac. VII Int. Fitopatología*. Chihuahua, México. C-32.
- Lozoya-Saldaña H, Hernández-Vilchis A (2001) Compuestos registrados y de la sección 18 para el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De By) en papa en Toluca, México. *Agrociencia* 35: 451-458.
- Martínez-Tellez MA, Lafuente M T (1997) Effect of high temperature conditioning of ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune marduly fruit. *J. Plant Physiol.* 150: 674-678.
- Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RM (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant enzyme in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76: 456-459.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell. Repr.* 24: 255-265.
- Waterman PG, Mole S (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell. Oxford, RU. 238 pp.