

ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA RESISTENCIA DE LA PAPA

(*Solanum tuberosum*)

AL ATAQUE DEL HONGO

*Phytophthora infestans*¹

Sonia Jaramillo V. I.A. M Sc²

Diego A. Rojas L.²

INTRODUCCION

La enfermedad del Tizón Tardío o Gota de la papa causada por el hongo *Phytophthora infestans* ha sido el principal problema fitosanitario de este cultivo por siglo y medio, desde la hambruna irlandesa en la década de 1840. A nivel mundial se gastan en su control miles de millones de dólares.

Actualmente, se presenta una aparición de la forma A₂ del hongo con el consecuente aumento de su variabilidad genética y por ende aparición de nuevas razas con posibilidad de mayor agresividad y se considera que la posibilidad de grandes pérdidas en los cultivos es cuestión de poco tiempo.

Se ha reportado resistencia de razas del hongo a diferentes fungicidas. Las herramientas biotecnológicas y el mejoramiento tradicional, buscan aunar esfuerzos para mejorar las condiciones de producción de este cultivo (CIP, 1995).

La obtención de nuevas variedades con resistencia de campo y realizar estudios básicos que permitan conocer la evolución del hongo y su grado de patogenicidad en diferentes ecosistemas es indispensable para formular programas de manejo racional de fungicidas.

¹ Revista Papa. Colombia. 1997.

² Grupo de Biotecnología. Universidad Nacional – Sede Medellín.

1. BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA

La resistencia de las plantas al ataque de patógenos, ha sido tradicionalmente agrupada en tres (3) categorías:

1.1. Resistencia vertical o específica de raza: que confiere inmunidad a una variedad específica frente a una raza del patógeno, gobernada por genes mayores y por lo tanto heredables de forma mendeliana.

Este tipo de resistencia ha sido usada tradicionalmente para conferir resistencia a la gota, por cruzamientos de variedades comerciales con la especie Silvestre *Solanum demissum* (L).

Recientemente se ha determinado la localización de algunos genes de este tipo en los cromosomas (Leonarde - Schippers et al, 1992) además de algunos factores genéticos cooperativos, como genes represores o silenciadores.

1.2. Resistencia horizontal o de campo: se asume que es de tipo poligénica, de herencia cuantitativa y que confiere resistencia a la variedad, por disminución de la infección, la tasa de colonización del tejido y reducción de la esporulación (Umaerus, 1970). Las bases moleculares y bioquímicas de este tipo de resistencia son básicamente desconocidas y el mejoramiento por esta vía se ha realizado por técnicas convencionales. Este tipo de resistencia se presenta en: *S. verrucosum*, *S. tuberosum cv PimperneJ.*, *S. sucrense.*, *S. microdontum*.

Los genes implicados en esta resistencia, son localizados mediante el rastreo de locus segregantes, para caracteres y frecuencias cuantitativas (QTL), en cruzamientos con materiales diploides que muestran resistencia de campo y en los cuales no se presentan genes mayores (Línea S.).

1.3. Resistencia de no hospedero: es aquella que se presenta en especies silvestres, algo alejadas del material de cultivo y generalmente no tuberíferas, donde el hongo es incapaz de infectar a las plantas. Dicha forma de resistencia se presenta en *Solanum nigrum* (Yerba Mora).

A nivel bioquímico se conoce un poco sobre el mecanismo de resistencia, pero se cree que tiene que ver con el fenómeno de reconocimiento durante la primera etapa del proceso de patogénesis (Colon and Budding, 1988; Corné et al, 1992).

Actualmente el C.I.P. está desarrollando líneas promisorias con resistencia horizontal, evaluando selecciones avanzadas de clones con resistencia vertical múltiple (Líneas A) y con resistencia de campo (Líneas B), que serán utilizadas posteriormente para el mejoramiento de variedades comerciales, mediante cruzamientos introgresivos.

2. BASES BIOQUIMICAS DE LA RESISTENCIA

El desarrollo de la enfermedad del tizón tardío depende de varios procesos que se han estudiado por separado: uno de ellos es la agresividad del patógeno y el otro es la capacidad de respuesta del hospedero. Las esporas de todas las razas del hongo, germinan con igual eficiencia en las variedades resistentes y susceptibles y las frecuencias son equiparables (Gees y Hohl, 1988).

La diferencia fundamental se presenta en el tiempo requerido para la síntesis de compuestos inhibitorios al hongo, como callosa, lignina, fenoles, fitoalexinas, glicoalcaloides, proteínas del patógeno relacionadas e inhibidores de proteinasas.

Estos mecanismos en conjunto, juegan un papel determinante en la resistencia al hongo y ninguno de ellos por separado ha demostrado ser eficiente al respecto; tal vez por esto se les considera caracteres cuantitativos, aunque a algunos en la categoría de genes mayores o cualitativos.

A continuación se discuten algunos apartes importantes de estos mecanismos de resistencia, de acuerdo a su origen biosintético. Una información más detallada escapa al alcance de este artículo, pero está disponible en numerosos documentos. Tampoco se discutirán aspectos relativos a los mecanismos de hipersensibilidad (HA), ya que estos son bastante complejos y requerirían de un artículo completo.

2.1. Compuestos defensivos sintetizados por la ruta de los fenilpropanos (Acido sh;- químico).

Por esta ruta se producen compuestos simples como los fenoles tipo fitoalexina (ácido clorogénico, caféico y p. cumárico) productos del pardeamiento enzimático generalmente asociados a la hipersensibilidad a las cuales se le han atribuido importantes funciones como inhibitorios de la esporulación, en interacciones compatibles; pero dado que estos compuestos se presentan asociados con la hipersensibilidad en casos compatibles e incompatibles de interacción, es difícil discriminar entre el efecto de los fenoles constitutivos y los de síntesis de novo y su efecto en la resistencia a *P. infestans*. Por dicha ruta también se producen sustancias complejas como lignina y callosa, altamente correlacionadas con la resistencia fólica a *P. infestans*.

El papel de tales componentes se fundamenta en las observaciones isoenzimáticas de la P.AL (fenil alanina amonio liasa) y la 4 CL (4 cumarato ligasa), dos enzimas de control de esta ruta biosintética, que incrementa su síntesis tras la infección del hongo a través del follaje. Estas mismas enzimas juegan un papel clave en la síntesis de lignina y callosa y se ha reportado una alta correlación entre síntesis deposición de callosa y resistencia foliar en algunas variedades. La máxima síntesis de estos compuestos se logra a nivel de RNAm a

las tres horas desde la inoculación, pero es casi nula a las seis horas (tres horas después). Este fenómeno también se presenta a nivel de tubérculos, por lo que no se ha esclarecido aún el verdadero aporte de estos polisacáridos a la resistencia al hongo, aunque se sabe que el bloqueo de esta ruta biosintética aumenta la susceptibilidad de los cultivares a dicho patógeno (Comé et al, 1992).

2.2. Compuestos de la ruta acetato - mevalonato (terpenos).

Por esta ruta biosintética se producen dos grupos de compuestos muy importantes en papa, como son los glicoalcaloides esteroidales (Alfa, Beta chaconina, solanina y solamarina) y las fitoalexinas sesquiterpénicas (rhisitina, phytuberina, solabetivona, ilubimina); la ruta de síntesis es divergente y antagónica para los dos grupos.

La síntesis de glicoalcaloides esteroidales a partir del FPP (farinil pirofosfato) es regulada por la enzima escualeno sintetasa, que es inhibida durante la producción de F.A sesquiterpénicas, cuya síntesis es regulada por el grupo de las FPP ciclasas.

La información genética responsable de la síntesis de ambos compuestos está presente en las variedades resistentes y susceptibles, pero las constantes cinéticas (velocidad de síntesis y actividad enzimática), varía de un clon a otro.

Así mismo se han encontrado formas de isoenzimas expresadas diferencialmente, de acuerdo al tipo de daño o la condición de estrés, en las enzimas HMGR (hidroximetilglutaril coenzima H reductasa) y las FPP ciclasas, que son las responsables de la regulación de esta ruta biosintética.

También se han aislado RNAm diferencialmente expresados y correlacionados con la resistencia a una raza específica del hongo, cuya secuenciación es homóloga con DNA que codifica proteínas del tipo quinasa, reguladas por el etileno, cuya concentración está altamente correlacionada, con los incrementos en la síntesis F.A y la resistencia de *P. infestans*.

La ruta de síntesis de estos compuestos es considerada "simple" y susceptible de ser manipulada genéticamente, mediante tres estrategias básicas:

- Logrando la expresión más eficiente del DNA que codifica las formas isoenzimáticas más activas de la HMGR CoA reductasa y las FPP ciclasas, lo que repercutirá en una síntesis acelerada de los compuestos inhibitorios.
- Manipulando la expresión de la proteína quinasa, responsable de la expresión temprana de la HMGR CoA reductasa, rompiendo su dependencia de los niveles de etileno, que generalmente se deprimen, por la selección contra factores de floración y maduración de frutos.

- Introduciendo ONA foráneo, que codifique formas FPP ciclasas, que ocasionen síntesis de nuevas formas terpénicas cíclicas, como la ipomoearina (Ipomoea batatas) u otra fitoalexina, luego de someter al hongo a prueba de toxicidad para dichos compuestos.

Las funciones de las fitoalexinas y fitoalexinas terpénicas en la resistencia parece bastante prometedora. Sin embargo, en síntesis acelerada inhibe el crecimiento de la hifa del hongo, pero no los niveles de esporulación del mismo; además, los niveles de fitoalexinas en interacciones compatibles son muy bajos y por tanto incapaces de afectar el desarrollo del hongo, cosa que no ocurre en interacciones incompatibles. Por tanto, este tipo de resistencia podría ser interpretada como vertical, ya que aparentemente responde a interacciones del tipo gen por gen, aunque a la fecha se conocen tres factores genéticos que regulan la expresión de las proteínas responsables de la síntesis de estos compuestos y su carácter cuantitativo.

Por otra parte, solo existe un reporte bibliográfico que documenta la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas en hojas y su correlación alta con la resistencia al hongo, en contraste con la amplia documentación al respecto, en tubérculos.

En cuanto a los glicoalcaloides esteroidales, al parecer no juegan un papel importante en la resistencia de la papa a *P. infestans*, mas si lo hacen en todo tipo de patógenos como *Streptomyces scabies*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani* y algunas plagas importantes. Al igual que los fenoles, estos compuestos son introducidos por condiciones de estrés y también se presenta en forma constitutiva, pero es difícil diferenciar estos dos aspectos en los ensayos biológicos.

2.3. Compuestos proteicos

En este tópico solo se tratarán dos grupos de compuestos de tipo proteico, como son las proteínas patógeno relacionadas (PRP) y los inhibidores de proteinasas de tipo proteína. Las primeras son sintetizadas luego de la exposición de los tejidos al hongo y se acumulan en los espacios intercelulares. Ocho de estas proteínas han sido identificadas en papa y corresponde a seis quitinasas y de 1,3 Seta glucanasas. Los patrones de expresión de estas proteinasas son similares a los de la PAL y 4CL, tanto en interacciones compatibles como incompatibles.

Aunque estas proteínas (principalmente glucanasas) son capaces de hidrolizar la pared del hongo, no existe evidencia concluyente que relacione éstas con la resistencia a *P. infestans*, dado que los niveles de expresión logrados en plantas transgénicas son muy bajos y no permiten una aproximación estadística importante.

La única proteína que ha sido reportada con efecto inhibitorio a *P. infestans* es taumatinosmotina, una permeasa que fue aislada de tabaco y tomate, cuyo efecto es la lisis de esporangios y la inhibición del crecimiento hifal in vitro (Woloshuk et al, 1991).

En cuanto a los inhibidores de proteinasas para papa, se han reportado inhibidores de pepsinas (tripsina y quimotripsina) y de enzimas maceradoras como celulasa y quitinasas, pero dada la poca importancia de estas enzimas sobre el proceso de patogénesis (el hongo penetra preferentemente por aberturas naturales y no mediante hidrólisis de pared celular del hospedero como sustrato) se ha retardado la investigación en este importante tópico.

Por último, otro tipo de proteínas que han sido implicadas con la resistencia al hongo, son las calmodulinas (reguladoras de Ca) y las poliubiquininas (degradación de proteínas intracelulares sin la conservación de la integridad de la cromatina y la expresión y regulación de receptores de membrana) pero su papel en la patogénesis aún debe ser resuelta, ya que altos niveles de expresión, no implica necesariamente factores de resistencia determinantes. Además, las secuencias de las proteínas quininas (ver anterior) poseen un segmento homólogo de las calmodulinas, haciendo en cierto grado innecesaria la expresión de dichas proteínas.

3. CONCLUSIONES

A pesar del gran volumen de información con respecto a la interacción papa *Phytophthora infestans*, ésta es demasiado fraccionada y corresponde a condiciones muy heterogéneas en cuanto a material vegetal evaluado y aislamientos del hongo. A la fecha sólo existe un reporte que involucra la evaluación de variedades tipo andígena y ninguno con respecto a los materiales silvestres de los géneros *Solanum* o afines (en cuanto a bioquímica y biología molecular se refiere, apropiado para nuestras condiciones (variedades cultivadas con origen genético incierto y razas muy complejas del hongo).

Por lo tanto, la investigación en este patosistema apenas comienza para el país, y es necesario desarrollar tópicos como el mejoramiento por cultivo de tejidos, la bioquímica y otros, para establecer el grado de homología entre las dos grandes acepciones de *Solanum tuberosum* (*spp. tuberosum* y *ssp. andígena*) y las variedades silvestres no tuberíferas, al igual que los aspectos que atañen al hongo *P. infestans*, del cual se tienen aún menos datos concluyentes.

Estamos seguros de que este modelo de investigación, por su gran complejidad, puede establecer un precedente claro en otro tipo de patosistemas, contribuyendo de forma determinante al éxito de los programas biotecnológicos en el país.

Hay poca información sobre la interacción de las variedades de papa colombianas y la interacción de éstas con las razas complejas del hongo *P. infestans*, por lo tanto con el macroproyecto "Caracterización genética del patosistema *P. infestans* - *Solanum tuberosum* y la relación con polimorfismos moleculares el cual está desde el punto de vista celular, molecular, bioquímico y demás tópicos biotecnológicos permitirá establecer parámetros útiles para el mejoramiento genético y obtención de nuevas variedades y el manejo del patógeno de una manera más racional tratando de reducir las aplicaciones de plaguicidas y el desarrollo de resistencia del hongo a fungicidas

BIBLIOGRAFIA

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Informe anual 1995. Edición No.25.

COLON, L.T. and Budding, D.J. Resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) ten wild *Solanum* species. *Euphytica*, 77 -86 (1988).

CORNE, M.J., Pleterse, Pierre J.G.M. De Wit and Francine PM. Govers. Molecular aspects of the potato -*Phytophthora infestans* interaction. *Neth, J. Pl. path.* Vol. 98 (1992). Suplemento.

LEONARDE -SCHIPPERS, C, Gieffers, W., Salamini F. & Gebhardt, C., 1992. The R, gene conferring race - specific resistance to *Phytophthora infestans*. In potato is located an potato chromosome V. *Molecular and General Genetics*. Vol. 283, p. 278 -283.

UMAERUS, V. 1970. Studies on field resistance to *Phytophthora infestans* 5 Mechnisms of resistance and aplication to potato breeding. *Molecular plant microbe Interactions*. Vol. 3, p. 72 -77.

GEES, R. y HOLH. H.R. 1988. Cytological comparision of specific (Ra) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. *Phytopatology*. 78. 350 -357.

WOLOSHUK, C.P. MEULENHOF, EJS, Sela - Buurlage, M. Van den Elzen, P. JM. y Cornelisson, B JC 1991. Pathogen induced proteins with inhibltory activity toward *Phytophthora infestans*. *The plant soil*. Vol. 3, p. 619 -628.