



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

400282



61060

ACTIVIDAD DE UN EXTRACTO DE *Saccharomyces cerevisiae* COMO ESTIMULADOR DE LA RESISTENCIA A LA ANTRACNOSIS EN PLANTULAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L) CV. FLOR DE MAYO.

B01213/96

Ej. 3

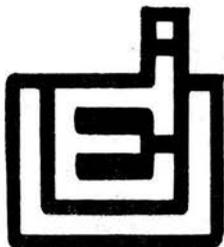
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA TERESA MALDONADO CALDERON



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO,

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES

***Emilia Calderón Zúñiga y
Gaspar Maldonado Hernández.***

Por su apoyo y confianza.

A MIS HERMANOS

Lety, Vero, Gil y Lupita

A MIS SOBRINOS

Daniel, Gaby y Fabiola

A mi tía Anita, Norma, Silvia, Ricky, Lalo y Dianis

A mis compañeros de generación en los cuáles siempre he encontrado un gran apoyo y un gran espíritu de constante superación: Martha, Renata, Silvia, Rosa, Susana, Claudia, Fabiola, Lucía, Alejandra, Gloria Rodolfo y Salvador.

INDICE	página
INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
AGRADECIMIENTOS	VI
1. INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVOS	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Enfermedades de las plantas	5
2.2 Enfermedades del frijol	7
2.3 Mecanismos de penetración de los patógenos	9
2.4 Mecanismos de resistencia a enfermedades de las plantas	10
2.5 Fitoalexinas	14
2.5.1 Fitoalexinas en leguminosas	15
2.5.2 Acumulación y detoxificación de fitoalexinas	17
2.6 Estimulación de fitoalexinas	18
2.6.1 Estimuladores fúngicos	20
2.7 Resistencia inducida a patógenos	22
2.7.1 Resistencia inducida a nivel local	25
3 MATERIAL Y METODOS	26
3.1 Material biológico	27
3.2 Metodología	
3.2.1 Germinación de semillas	27
3.2.2 Establecimiento de cultivos hidropónicos	27
3.2.3 Mantenimiento de la cepa de <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i>	28
3.2.4 Obtención de la fracción estimuladora de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.2.5 Determinación de carbohidratos	29

3.2.6 Ensayos de la actividad estimuladora de faseolina	30
3.2.7 Resistencia inducida a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Actividad de la fracción cruda de levadura	33
4.2 Actividad estimuladora de fracciones del extracto crudo de levadura	34
4.3 Actividad estimuladora de fracciones del extracto de levadura después de hidrólisis ácida	35
4.4 Hidrólisis enzimática de la fracción cruda de levadura	35
4.5 Cromatografía en papel de las fracciones del estimulador de levadura	37
4.6 Inducción de resistencia a la antracnosis	37
5 DISCUSION	54
6 CONCLUSIONES	62
7 APENDICE	65
8 LITERATURA CONSULTADA	70

INDICE DE TABLAS

pág.

Esquema 1. Multicomponentes de la resistencia a la enfermedad en plantas	13
Tabla 1. Producción neta de faseolina por el extracto crudo	41
Tabla 2. Actividad inductora del hidrolizado enzimático	46
Tabla 3. Azúcares de las fracciones del extracto de levadura analizados en cromatografía descendente en papel	49
Cuadro A1. Parámetros de las lesiones por antracnosis en hipocotilos de plántulas de frijol	68
Cuadro A2. Rf de los componentes de las fracciones de levadura	69

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Cinética de acumulación de faseolina	40
Figura 2. Perfil de elución en Biogel-P6 de la fracción cruda de levadura	42
Figura 3. Estimulación de faseolina por los picos I, II y III	43
Figura 4. Perfil de elución en Biogel-P6 del hidrolizado ácido de la fracción cruda de levadura	44
Figura 5. Estimulación de faseolina por los picos HI, HII y HIII	45
Figura 6. Perfil de elución en Biogel-P6 del hidrolizado enzimático de la fracción cruda de levadura	47
Figura 7. Estimulación de faseolina por los picos a,b,c,d y e	48
Figura 8. Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 0 h de incubación	50
Figura 9. Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 24 h de incubación	51
Figura 10. Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 48 h de incubación	52
Figura 11. Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 72 h de incubación	53

LISTA DE ABREVIATURAS

GRPH	Glicoproteína rica en hidroxiprolina
FAL	Fenil alanina amonio liasa
POX	Peroxidasa
PRP	Proteínas relacionadas a la patogénesis
RH	Respuesta hipersensible
ARNm	Acido ribonucleico (mensajero)
CHS	Chalconasintasa
CHT	Quitinasa
U.V.	Ultravioleta (luz)
RSA	Resistencia sistémica adquirida
RLA	Resistencia local adquirida
RA	Resistencia adquirida
AIN	Acido isonicotínico
TMV	Virus del mosaico del tabaco
EPDA	Ejote-papa-dextrosa-agar
PD	papa-dextrosa

RESUMEN

Las plantas en general poseen mecanismos de defensa contra las enfermedades fúngicas, entre los que se encuentra la síntesis de sustancias antibióticas o fitoalexinas. Algunas componentes derivados de la pared fúngica son reconocidos por las células vegetales como una señal de la invasión y responden activando sus mecanismos de defensa.

En este estudio se utilizó un extracto crudo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que fue inoculado en hipocotilos de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. flor de mayo) [0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] para medir en una cinética la acumulación de faseolina estimulada con mediciones a 0, 24, 48 y 72 horas de incubación. La mayor concentración de la faseolina se detectó a las 24 horas de incubación con el extracto crudo de levadura.

De la separación del extracto crudo por filtración en una columna de Biogel-P6 se prepararon 3 mezclas que se nombraron: I, II y III las cuáles se inocularon en hipocotilos de plántulas de frijol [0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] que se incubaron por 24 horas, midiendo la concentración de faseolina al término del período mencionado. La mayor actividad se registro por la inoculación del pico II que corresponde a fragmentos de tamaño medio (oligómeros).

El hidrolizado ácido (HCl 2M) del extracto crudo fue separado por filtración en una columna de Biogel-P6 y en base al perfil de elución se prepararon 3 mezclas denominadas HI, HII y HIII. Estas 3 mezclas se inocularon a hipocotilos de frijol [0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] y se incubaron por 24 horas para medir la faseolina acumulada. Los picos HII y HIII presentaron la mayor actividad.

El extracto crudo fue sometido a hidrólisis enzimática con liticasa y evaluada la actividad estimuladora de faseolina en hipocotilos de frijol a la concentración referida anteriormente para las fracciones soluble e insoluble. Se encontró la mayor actividad en el sobrenadante el cual fue separado por filtración en una columna de Biogel-P6 y del perfil de elución resultante se prepararon 5 mezclas que se nombraron como a, b, c, d y e.

Las mezclas que inoculadas en hipocotilos de plántulas de frijol estimularon una mayor concentración de faseolina fueron las **b, c y d**, que se ubican dentro del rango de fragmentos tipo oligómeros.

Se analizaron en cromatografía descendente en papel la fracción cruda así como la mezclas obtenidas por filtración en Biogel-P6 (I, II, III, HI, HII, HIII, a, b, c, d y e). Se detectó en todas las muestras la presencia de glucosa como constituyente principal, en los picos I, II, III, HI, HII y HIII se refiere la probable presencia de manosa siendo difícil asegurar su presencia debido a la poca sensibilidad del método utilizado para el análisis de las azúcares. En la fracción cruda y los picos II, III y HIII se detectó un tercer azúcar en poca cantidad.

Finalmente plántulas de 7 días de edad que se inocularon con la fracción cruda de levadura [$0.15\mu\text{g}/\mu\text{l}$] e incubaron por 0, 24, 48 y 72 horas, se desafiaron con el fitopatógeno del frijol, agente causal de la antracnosis, *Colletotrichum lindemuthianum*. Se realizaron observaciones finales de las lesiones a los 10 días de incubación con el hongo registrándose 4 niveles de infección (grado 0 ó daño inexistente, grado 1 ó daño moderado, grado 2 ó daño severo y grado 3 ó daño profundo y muerte) (Chávez, 1993). Se encontró que los mayores porcentajes de plantas protegidas por el pre-tratamiento con la levadura correspondieron al período de incubación de 24 horas que coincide con la mayor concentración de faseolina medida en las plántulas.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial mi agradecimiento a la Dra. Eva Luz Soriano B. por la dirección de este trabajo, el cuál se realizó en el laboratorio de Bioquímica Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Asimismo, agradezco la valiosa ayuda recibida de el Dr. Rafael Salgado Garciglia durante la realización del escrito así como las facilidades otorgadas para el uso del área de cómputo del Instituto por el Dr. Alfredo Saavedra Molina.

Al Dr. Mauro Martínez P., Q.F.B. Mónica Clemente G. y a la Biol. Ma. Elena Granados deseo expresarles mi gratitud por sus comentarios y opiniones recibidos durante la realización de este trabajo.

Y por supuesto a mis compañeros tesistas Cecilia Jiménez A., Maribel Nava M., Julio César Espinoza C. y Elia Diego G. con quienes compartí gratos momentos.

Actividad de un extracto de Saccharomyces cerevisiae como estimulador de la resistencia a la antracnosis en plántulas de frijol (Phaseolus vulgaris) cv. flor de mayo.

1. INTRODUCCION

En la naturaleza los organismos se encuentran interactuando con su medio ambiente y con otros organismos. Existen por lo tanto, varios tipos de interacciones dentro de las comunidades biológicas, que pueden ser neutras, benéficas o antagonistas (Stolp, 1988; Atlas, 1989; Bidwell, 1993). Así, las interacciones neutras y benéficas se pueden considerar como positivas, ya que las poblaciones implicadas pueden incrementar su capacidad de sobrevivir en un determinado habitat. Por otra parte las interacciones antagonistas o negativas implican entre otros factores la competencia por nutrimentos (Stolp, 1988; Atlas, 1989).

Cuando un organismo provoca daño a otro con su presencia, se establece una relación de parasitismo, que da por resultado el desarrollo de la enfermedad en el organismo dañado (hospedero)(Bidwell, 1993). Los microorganismos (virus, bacterias, hongos) establecen importantes relaciones con las plantas y una amplia variedad de éstos las dañan provocándoles enfermedades; sin embargo, las plantas en general resisten al ataque microbiano y excepcionalmente se enferman ya que cuentan con múltiples mecanismos para contrarrestar la infección, que incluyen barreras físicas y bioquímicas constitutivas e inducidas (Ebel, 1986; Stolp, 1988; Kúc, 1990; Bidwell, 1993).

La dispersión del patógeno depende entonces de la estructura y potencialidad bioquímica de la planta y del mismo patógeno; por ejemplo, las superficies externas vegetales son estructuras muy complejas que dificultan la penetración de microorganismos; además se sabe que en el tejido vegetal hay sustancias preexistentes como compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, glucósidos cianogénicos, etc., los cuales inhiben el desarrollo del patógeno una vez que penetra los tejidos; asimismo se pueden estimular respuestas de defensa a nivel local y sistémico que bloquean la diseminación de los microorganismos (Atlas, 1989; Harborne, 1990; Manners, 1993; Dixon et al., 1994).

Además del microorganismo mismo, las células vegetales pueden reconocer moléculas que actúan como estimuladoras de defensas y se producen en respuesta a éstas, sustancias tales como compuestos fenólicos oxidados, callosa, lignina, glicoproteína rica en hidroxiprolina (GRHP), inhibidores de proteasas, etc. (Kúc, 1990; Barz et al., 1990); especial atención se da a la biosíntesis y rápida acumulación de compuestos isoflavonoide con actividad antimicrobiana de bajo peso molecular llamados fitoalexinas que son lipofílicos y se localizan alrededor del sitio de infección con un aparente efecto local (Barz et al., 1990; Manners, 1993). Se sabe que plantas que tienen la habilidad de acumular en poco tiempo fitoalexinas pueden resistir la infección (Cline et al., 1978; Stolp, 1988; Kúc, 1990).

Las moléculas estimuladoras pueden ser bióticas o abióticas en su origen. Los estimuladores abióticos que inducen la acumulación de fitoalexinas incluyen agentes físicos como las heridas, luz ultravioleta, el congelamiento o calentamiento drástico; y agentes químicos como detergentes, metales pesados o cloroformo (Darvill y Albersheim, 1984). Los estimuladores bióticos capaces de inducir la acumulación de fitoalexinas, son compuestos varios derivados del metabolismo de microorganismos. Estos se pueden separar en dos grupos, por un lado los estimuladores bióticos exógenos que son componentes estructurales de microorganismos como carbohidratos de la pared celular de hongos, lípidos, glicoproteínas fungales, etc., por otro lado, los estimuladores bióticos endógenos son fragmentos de naturaleza péctica, principalmente oligogalacturónidos constituyentes de las paredes celulares vegetales (Yoshikawa, 1983; Ebel, 1986; Sivan, 1992). Se ha descrito en algunos tejidos vegetales que el tratamiento con moléculas estimuladoras de naturaleza oligosacárida principalmente del tipo β -glucano, constituyentes de la pared celular de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phytophthora megasperma var. sojae* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, estimulan la acumulación de la fitoalexina faseolina en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y la gliceolina en frijol soya (*Glycine max* L.) (Darvill y Albersheim, 1984).

Una estrategia que se ha desarrollado en la protección de las plantas contra las enfermedades microbianas es la llamada protección cruzada o inducción de resistencia que involucra la estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos, previa inoculación de la planta con cepas avirulentas o taxonómicamente relacionadas. En estudios de inducción de resistencia utilizando un microorganismo como inductor de respuestas de defensa, se ha observado que ésta no es específica ni con respecto al microorganismo inductor de la resistencia ni al patógeno de desafío (Smith et al., 1991; Ward et al., 1991; Sivan, 1992).

El estudio de nuevas tecnologías tendientes a buscar alternativas no tóxicas para el control de enfermedades vegetales se ha incrementado en los últimos años. Es un hecho innegable la contaminación de alimentos, reservas acuíferas y suelo por pesticidas debido al incremento dramático de su uso en las últimas tres décadas (Ryan, 1991).

Por lo tanto, es importante estudiar la inducción de los mecanismos de defensa a enfermedades en plantas de interés agrícola, como el frijol, por el uso de microorganismos no patógenos como *Saccharomyces cerevisiae* y desarrollar métodos alternativos de control biológico; una ventaja es que a diferencia del estimulador obtenido de hongos fitopatógenos que ha sido empleado en otros estudios, el estimulador de levadura puede obtenerse fácil y rápidamente, en mayores cantidades y a menor costo.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de un extracto de *Saccharomyces cerevisiae* como estimulador de faseolina y del aumento de resistencia a la antracnosis en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) cv. flor de mayo.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1.2.1 Realizar ensayos de estimulación de faseolina por tratamiento con fracciones del extracto de *Saccharomyces cerevisiae* en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. flor de mayo

1.2.2 Determinar el contenido de glucanas de las fracciones del estimulador de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.3. Determinar en plántulas de frijol (*P. vulgaris* L.) cv. flor de mayo la resistencia inducida al hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magnus) Lams.-Scrib. por inoculación de un extracto de *S. cerevisiae*.

2. ANTECEDENTES

La especie *Phaseolus vulgaris* L. forma parte de la familia Leguminosae de la subfamilia Papilionidae, perteneciente al orden Rosales; es una planta herbácea, anual, con hojas trifoliadas y alternadas. Su origen probable es el área comprendida entre México y Guatemala, está ampliamente distribuída en muchas zonas de los trópicos, subtrópicos y regiones templadas con temperaturas óptimas para su crecimiento que varían entre los 16 y 24° C. Las semillas de esta leguminosa constituyen el alimento más importante de América Latina y parte de África (Kay, 1979; National Academy of Science, 1979; Sánchez, 1980).

Más de un tercio de la producción mundial de frijol es aportada por América Latina, es un cultivo básico en la dieta alimenticia de la región e importante fuente de proteína, fibra natural y calorías para el sector rural y urbano de bajos ingresos de esta zona.

El cultivo del frijol en México ocupa el 2° lugar en superficie sembrada después del maíz y se cultiva en todos los estados del país; sin embargo el rendimiento es bajo debido a varios factores, entre los que destaca principalmente la presencia de enfermedades (Díaz, 1993).

2.1 ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

La enfermedad se puede definir como una alteración del funcionamiento de los procesos fisiológicos vegetales y falta de coordinación conveniente de la producción y utilización de energía; se considera una degeneración progresiva de la actividad celular, que se manifiesta en cambios morfológicos o síntomas (Manners, 1993; National Academic of Science, 1981) y puede ser causada por factores bióticos o abióticos. Los factores químicos y físicos (abióticos) del ambiente pueden ocasionar enfermedades en las plantas si estos no permanecen dentro de ciertos límites, ya que todos los elementos del medio ejercen efecto

sobre uno o varios procesos fisiológicos de las plantas. Asimismo, cuando los materiales requeridos para el funcionamiento de las plantas no están disponibles en las proporciones adecuadas, éstas pueden sufrir anomalías como la alteración de forma, floración y fructificación abortiva y reducción en el crecimiento (National Academy of Science, 1979).

Por otro lado, las enfermedades de naturaleza infecciosa o bióticas, son causadas por microorganismos (virus, bacterias, hongos) e invertebrados como insectos y nematodos, e inclusive plantas superiores (Stolp, 1988; Atlas, 1989; Bidwell, 1993; Rojas, 1993; Nal. Acad. of Science, 1981). En el caso donde la enfermedad es ocasionada por un patógeno, la planta afectada sirve como fuente de materia orgánica y el agente causal crece y se reproduce con gran rapidez, además de que potencialmente se puede dispersar a otras plantas sanas y causar nuevos brotes de la enfermedad (Agrios, 1989).

Durante el proceso en el cual el patógeno y la planta están en contacto, están involucrados muchos factores que afectan a ambas entidades. El inóculo (el patógeno o parte de él que pueden producir infección, por ejemplo: esporas, micelio, larvas, etc.) debe estar en cantidad suficiente para diseminarse a las plantas por diferentes medios como el aire, agua, insectos, desechos de plantas, etc. Al depositarse sobre la superficie de la planta, pueden penetrarla en forma directa, a través de aberturas naturales (estomas, lenticelas, hidátodos) o por heridas. Una vez que el patógeno penetró a las células vegetales, éste se desarrolla y reproduce; se dan entonces cambios en la apariencia y funciones de las plantas, aparecen zonas necróticas o decoloradas y malformadas. El patógeno durante el proceso infectivo puede liberar al tejido vegetal sustancias biológicamente activas como enzimas, toxinas o reguladores de crecimiento, causando varios efectos en la planta como la desintegración o colapso de células, absición, marchitez, división y elongación celular anormal, etc.; esta alteración del metabolismo a nivel bioquímico y fisiológico afecta su ciclo vital causando inclusive la muerte (Agrios, 1989; Atlas, 1989).

2.2 ENFERMEDADES DEL FRIJOL

El frijol esta sujeto al ataque de un gran número de enfermedades y esto es considerado como el mayor factor limitante de la producción en los trópicos. La prevalencia y severidad de muchas enfermedades están relacionadas con factores como la temperatura y la humedad; por ejemplo, las enfermedades bacterianas y fungales son generalmente más importantes en tierras bajas y húmedas de los trópicos y subtropicos. Aunque anualmente se cosechan cerca de 10 toneladas de frijol en el mundo, la producción se ve afectada cada año en gran medida por los problemas ya mencionados (National Academy of Science, 1979; Pastor et al., 1995). En México hay identificadas por lo menos 25 diferentes enfermedades relacionadas a este cultivo (Lepiz, 1986). Dentro de las enfermedades que más afectan esta leguminosa se encuentran las royas, pudrición carbonosa, pudrición por *Rhizoctonia*, tizón común y antracnosis que son causadas por hongos; los virus causan el mosaico común, mosaico sureño y mosaico dorado; los agallamientos de la raíz por nematodos entre otras (Díaz, 1993).

Los daños a la producción dependen del área de cultivo (Lepiz, 1986), ya que condiciones como la temperatura, humedad relativa y precipitación favorecen el desarrollo de uno o varios patógenos (Campos, 1987); también influye la etapa de crecimiento y la variedad de frijol que se cultiva; es decir, el daño depende de la relación que se da en un momento dado entre la planta, el patógeno y el ambiente.

ANTRACNOSIS. La antracnosis es probablemente la enfermedad más importante del frijol común y se han reportado pérdidas en frijol por causa de esta enfermedad en muchos países del mundo; está distribuida en todos los países productores de frijol, sin embargo, causa mayores daños en zonas templadas y subtropicales.

La antracnosis se encuentra reportada en 14 estados productores de frijol en México, sobre todo en la zona húmeda y templada lluviosa del país, siendo más severa en la zona húmeda cuando las temperaturas oscilan entre los 15 y 20°C y existe una alta humedad ambiental, provocando graves daños en variedades susceptibles. Las zonas productoras de frijol en donde se presenta la antracnosis, representan alrededor del 75% del total de la superficie de frijol sembrado en México; y son altamente vulnerables al desarrollo de epifitias debido a que son áreas compactas y el agente causal es dispersado inclusive por el roce de hojas entre si. Respecto a las pérdidas que causa en el rendimiento, hay reportes en México de pérdidas en producción de hasta 47% en frijol, sólo por esta enfermedad (Lepiz, 1986; Campos, 1987; Díaz, 1993)

El hongo que provoca la enfermedad, *Colletotrichum lindemuthianum*, es considerado como el principal problema fitopatológico en México favorecido por el clima fresco, alta humedad relativa y lluvias frecuentes; pertenece al grupo de los deuteromycetes u hongos imperfectos, que presentan micelio septado y ramificado, producen conidios unicelulares, hialinos con una vacuola, oblongos o cilíndricos (Campos, 1987; Atlas, 1988). Este patógeno presenta diversas razas fisiológicas que pueden variar de un lugar a otro y aún dentro del mismo lugar, lo que dificulta su control en el campo (Lepiz, 1986). La enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones negras en hojas, tallos, vaina, peciolas, estructuras florales y semillas a manera de manchas color pardo, con bordes oscuros; en condiciones de alta humedad aparecen sobre la superficie de las manchas exudados de color rosado, debido a la esporulación. Al atacar la vaina forma lesiones hundidas y oscuras; la semilla puede infectarse y la enfermedad permanecer latente, por lo que para su cultivo se recomienda el uso de semilla libre del patógeno y uso de variedades mejoradas (Campos, 1987; Tu, 1992; Manners, 1993; Díaz, 1993).

2.3 MECANISMOS DE PENETRACION DE LOS PATOGENOS

Como ya se mencionó las enfermedades infecciosas resultan de la interacción de un organismo vivo (el patógeno) con otro (la planta huésped). Los factores ambientales y la constitución genética actúan sobre los procesos fisiológicos de la planta dando por resultado el crecimiento y desarrollo de la misma; de igual manera influyen sobre los organismos patógenos que podrán prosperar o sobrevivir en su relación con la planta huésped. Así un hospedero sensible, un patógeno agresivo y un ambiente favorable, pueden contribuir al establecimiento de la enfermedad (Agrios, 1989;).

Una vez que el patógeno se deposita sobre la superficie de la planta, puede penetrar al tejido vegetal por varios mecanismos; directamente por la acción mecánica de un apresorio como es el caso del hongo causal de la antracnosis que se adhiere a la epidermis y produce un gancho infectante que penetra la célula; por heridas, aberturas naturales como los estomas, lenticelas o hidátodos los cuáles son utilizados por hongos y bacterias para penetrar al tejido vegetal (Nat. Acad. of Science, 1981; Agrios, 1989).

Durante el proceso de penetración y colonización el patógeno puede producir enzimas que degradan la pared celular vegetal; este contacto extracelular es la primera interacción molecular entre ambas entidades. El éxito de la colonización del hospedero y supervivencia del hongo patógeno depende en gran medida de la capacidad de este último de internarse al tejido; en este contexto, las enzimas que degradan la pared celular vegetal juegan un papel fundamental durante el desarrollo de la enfermedad (Albersheim y Anderson, 1975; Cooper, 1983; Benhamou et al., 1990).

Los hongos producen una variedad de enzimas para establecerse en los tejidos vegetales; por ejemplo, las cutinasas que son esenciales en las primeras fases de penetración, ya que la capa cuticular es la primer barrera de las partes

aéreas de las plantas; también están presentes diferentes tipos de enzimas que degradan celulosa y polímeros pécticos. Se ha observado que las poligalacturonasas están entre las primeras secretadas por patógenos fungales. Además se producen una variedad de metabolitos tóxicos que son importantes en la virulencia de los invasores (Ouchi, 1991; Dori et al., 1995; Gao y Shain, 1995).

2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

La resistencia a la enfermedad en una planta esta relacionada a la constitución genética de la misma o del patógeno (Jauch, 1979), y se refiere a la habilidad para prevenir restringir o retardar el desarrollo de la enfermedad. Las plantas pueden evadir la enfermedad o los daños causados por ésta, ya que los mecanismos de resistencia pueden funcionar o ser inducidos restringiendo los grados de lesión de la enfermedad. Las interacciones incompatibles (donde no hay enfermedad) se han relacionado con diferentes cambios a nivel bioquímico en los tejidos desafiados que eventualmente detienen la invasión del patógeno (Schaffrath et al., 1995).

En este sentido la resistencia a la enfermedad es multifactorial, ya que son varias las respuestas involucradas a nivel local y sistémico. Como se ilustra en el esquema (No. 1) son varios los mecanismos que actúan en diferentes estados de la infección. Las superficies externas vegetales están recubiertas por biopolímeros como las ceras, cutina y suberina que son la primer barrera constitutiva que tienen que contrarrestar los patógenos; además los tejidos vegetales externos son ricos en compuestos fenólicos, alcaloides y diterpenos que inhiben el desarrollo de hongos y bacterias.

Una vez penetrada la barrera externa, los patógenos se topan con las paredes celulares y al romperlas dañan las células liberando los glicósidos contenidos en ellas, que son antimicrobianos y a su vez pueden hidrolizarse por la acción de glicosidasas produciendo fenólicos, quinonas y radicales libres altamente reactivos (Kúc, 1990).

Los cambios citológicos y fisiológicos que se presentan en las plantas están acompañados de la síntesis de enzimas que participan en varias rutas, sobre todo del metabolismo secundario el cual no sólo está involucrado en procesos vitales sino que se activa en respuesta a cambios medioambientales o circunstancias que impactan a la planta (Beckman, 1987).

En las leguminosas, los niveles de la fenilalanina-amonialiasa (FAL) y las peroxidasas (POX) se incrementan en tejidos vegetales después del ataque del patógeno; su papel en la defensa está mediado por su participación en la ruta de la biosíntesis de la lignina que tiene un importante papel en el reforzamiento alrededor de las lesiones en la pared celular y la formación de fitoalexinas isoflavonoides (Roulin et al., 1995). Se producen además enzimas hidrolíticas que actúan directamente sobre los hongos; la quitinasa inhibe el crecimiento fungal y al parecer actúa en coordinación con las β -1,3-glucanasas, las cuales se inducen después del desafío de la planta con diferentes patógenos. Estas enzimas forman parte del grupo de las proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP), las cuales son fundamentales para la planta contra el ataque fungal, ya que en las hifas de muchos hongos la quitina y la β -1,3-glucana son el principal componente estructural (National Academy of Science, 1981; Kúc, 1990; Joosten et al., 1995). Estas enzimas también se han encontrado en interacciones compatibles planta-patógeno (hay desarrollo de la enfermedad) por lo que no se restringe su acumulación a plantas que exhiben resistencia. En este sentido la diferencia entre la acumulación de las PRP en interacciones compatibles e incompatibles radica en el tiempo y magnitud de su inducción y ésto determinaría la resistencia o no de la planta (Roulin et al, 1995).

Por otro lado, también se ha asociado la resistencia a la producción de fitoalexinas alrededor de los sitios de infección o daño. Estas reacciones de defensa al parecer se encienden simultáneamente, pero no todas las plantas responden con la misma intensidad a la inducción de las diferentes rutas implicadas (Mansfield, 1983; Kúc, 1990; Barz, 1990).

PATOGENO



SUPERFICIE VEGETAL

CERAS	FENOLICOS
CUTINA	TERPENOIDES
SUBERINA	GLICOALCALOIDES

LOCALIZADA

PREFORMADA

TIONINAS
RADICALES LIBRES
QUINONAS

INDUCIDA

FITOALEXINAS
GRHP
CALLOSA
FENOLICOS

SISTEMICA

INDUCIDA

QUITINASAS
β-1,3-GLUCANASAS
PROTEASAS
PEROXIDASAS

**ESQUEMA 1. MULTICOMPONENTES DE LA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD
EN PLANTAS (Kúc, 1990).**

2.5. FITOALEXINAS

Las plantas producen numerosos metabolitos secundarios los cuales presentan una gran diversidad estructural que las proveen de una manera de ajustarse a los cambios en su medio y de interactuar con otros organismos. Algunos ejemplos de metabolismo secundario son las toxinas, repelentes, atrayentes, compuestos señal; además este tipo de compuestos está involucrado en varios mecanismos de defensa que las plantas han desarrollado contra organismos patógenos. Las fitoalexinas forman parte de los compuestos secundarios involucrados en la defensa vegetal, que se sintetizan *de novo* en respuesta al daño físico o señales químicas derivadas de organismos invasores y ayudan a inhibir la colonización de varios microorganismos parásitos y patógenos potenciales. El hecho de que las fitoalexinas estén ausentes en plantas sanas y se acumulen en los sitios de infección microbiana indica una función de defensa de las mismas (Darvill y Albersheim, 1984). Son compuestos antimicrobianos, de bajo peso molecular e incluyen una amplia variedad de compuestos naturales como isoflavonoides, flavonoides, estilbenos, coumarinas, terpenoides, etc.

Se conocen cerca de 300 fitoalexinas, de aproximadamente 35 géneros y cerca de 20 familias botánicas que se han estudiado; puesto que se sabe que hay aproximadamente 400 familias de plantas con flores, esto implica que quedan aún por investigar nuevos compuestos de defensa en plantas.

Las fitoalexinas se acumulan rápidamente y en altas concentraciones en interacciones incompatibles y se observa que esto es suficiente para inhibir el crecimiento fungal en el sitio de infección. La actividad biológica de las fitoalexinas ha sido ampliamente estudiada *in vitro* en diferentes tipos de bioensayos, y se ha visto que en general son tóxicas para hongos, bacterias, células vegetales e incluso para células animales; dañan a nivel membranal al patógeno: al alterar las membranas hay cese del flujo citoplásmico, fuga de electrólitos y metabolitos, pérdida del peso micelial y en general desorganización del contenido celular (Dixon et al., 1983). El amplio rango de organismos

afectados por las fitoalexinas sugiere que su toxicidad es no específica (Smith, 1982; Barz, 1990; Kúc, 1990; García, 1992).

La producción de fitoalexinas es sólo uno de los mecanismos inducibles de defensa que confieren resistencia a la enfermedad en plantas (otros ejemplos ya citados son: síntesis de enzimas hidrolíticas, reforzamiento de la pared celular vegetal por síntesis de lignina y callosa etc.). Se ha asociado la aparición de la respuesta de hipersensibilidad (RH) a la resistencia. La respuesta hipersensible es cuando los tejidos del huésped mueren en presencia del patógeno tan rápido, que éste queda aislado por un halo o anillo de tejido muerto, con la acumulación de fitoalexinas. Las células hospederas sufren necrosis y al parecer estas células muertas de las células vegetales funcionan como reservorio de la acumulación de fitoalexinas (Ebel, 1986; Rojas, 1993). Se cree que esta necrosis localizada sobre el tejido vegetal en el sitio de infección, limita la dispersión y multiplicación del patógeno. Aunque ha sido difícil asegurar si la RH es la causa o solo un síntoma de la resistencia, los resultados de Jakobek y Lindgren en 1993 con mutantes incapaces de estimular la RH, en donde se observó la producción de ARNm para enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas e hidrolasas como la FAL (fenilalanina amonio liasa), CHS (chalconasintasa) o CHT (quitinasa), apoyan la idea de que la transcripción de los genes de estas enzimas es un mecanismo distinto del asociado a la inducción de la RH.

2.5.1. FITOALEXINAS EN LEGUMINOSAS

Las leguminosas tienen una enorme importancia económica al proveer al hombre de alimento, sustancias con propiedades médicas o insecticidas, aceites, resinas, etc. y no es sorprendente el hecho de que una gran proporción de las fitoalexinas estudiadas pertenezcan a esta familia. Las familias de plantas pueden frecuentemente producir algún tipo particular de fitoalexinas, por ejemplo, en las

leguminosas predominan las isoflavonoides, en las solanaceas los sesquiterpenos, en las compuestas del tipo poliacetileno, etc. (Ingham, 1981).

Las vainas, hojas, tallos e hipocotilos son la principal fuente de muchas fitoalexinas, aunque también se han aislado de raíces, cotiledones y epicotilos. En *Phaseolus vulgaris* L. se han descrito al menos 15 fitoalexinas siendo 5 las más estudiadas: Faseolina, faseolidina, faseolinisoflavano, coumestrol y kievitona (Nuñez, 1985; Granados, 1986; García, 1992).

La faseolina fue aislada por Cruickshank y Perrin en 1963 de difusados de cavidades de semillas de vainas de frijol (*P. vulgaris* L.) inoculadas con *Monilinia fruticola*. Desde 1963 se ha visto que muchos otros hongos, agentes químicos y bacterias provocan la formación de faseolina (Bailey, 1973); esta fitoalexina es la que se produce en frijol de manera más abundante al desafiarse con *C. lindemuthianum* y se ha observado que a concentraciones muy bajas (menores de 5 µg de faseolina por gramo de peso fresco de tejido) se desarrollaron lesiones típicas de la antracnosis, por el contrario a mayores concentraciones de faseolina (300 µg/gpf) las lesiones fueron pocas y aisladas, ya que a la rápida acumulación de faseolina siguió una rápida muerte celular dando por resultado una interacción incompatible (Mansfield, 1982).

No todos los isoflavonoides producidos por las leguminosas tienen propiedad antibiótica ni todos se acumulan en los tejidos en respuesta a la infección, en este sentido se cree que algunos son precursores o intermediarios en la biosíntesis de fitoalexinas. Soriano y Medina en 1989 encontraron que en variedades mexicanas de frijol (Flor de mayo, Canario, Criollo, Rosita y Cacahuatate) son dos las fitoalexinas que se acumulan principalmente (faseolina y faseolidina) mientras que la kievitona, coumestrol y faseolinisoflavano se mantuvieron en niveles basales.

2.5.2. ACUMULACION Y DETOXIFICACION DE FITOALEXINAS

La enzima FAL esta involucrada en el primer paso de la biosíntesis fenilpropanoide que lleva a la formación de las fitoalexinas isoflavonoides característico de las leguminosas. Se ha observado un incremento en la actividad de ARNm para esta enzima en respuesta a diversos estímulos ambientales y al uso de estimuladores de hongos y plantas (Dixon, 1986).

Son muchas las enzimas requeridas para la síntesis de fitoalexinas, sin embargo no se conocen en su totalidad. Se sabe que algunos compuestos de la ruta están involucrados en otros procesos que se requieren para la formación de compuestos constitutivos; en vista de que la acumulación de fitoalexinas es inmediata al ingreso del patógeno, se postula que estarían como conjugados glicosilados almacenados en la vacuola, de manera que la respuesta no dependería solamente de la inducción de la ruta de biosíntesis si no también de la hidrólisis de los precursores (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Ibarra, 1993). Por otro lado, las plantas no sólo las producen si no que también las catabolizan. Esto es una ventaja porque son sustancias tóxicas, por lo que los niveles máximos de estos compuestos acumulados en la planta desafiada están determinados por el metabolismo tanto de la planta como del patógeno (Darvill y Albersheim, 1984; Ebel, 1986; Barz et al., 1990; Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

La detoxificación de las fitoalexinas es un evento que muchos patógenos realizan, de manera que la tolerancia de muchos hongos a las fitoalexinas se debe a este proceso; puede involucrar la completa degradación de la fitoalexina o en una reacción de pocos pasos formar un compuesto menos tóxico (Van Etten et al., 1982).

En general la importancia de las fitoalexinas en la resistencia a la enfermedad ha sido evaluada de diferentes maneras, por ejemplo, midiendo sus

concentraciones en los sitios de infección o desafío, evaluando la inhibición del crecimiento fungal, relacionando la patogenicidad del hongo con la tolerancia a fitoalexinas y recientemente utilizando técnicas de Biología Molecular encaminadas a elucidar el control de la síntesis de estos compuestos, desde el o los mecanismos de reconocimiento hasta la expresión de los genes involucrados (Mayama et al., 1995).

2.6 ESTIMULADORES DE FITOALEXINAS

El término estimulador ("elicitor") es usado para referirse a moléculas que inducen la síntesis de fitoalexinas en plantas y se refiere a compuestos de origen biótico o abiótico. El uso del término estimulador se ha ampliado no sólo a la acumulación de fitoalexinas si no a otras respuestas asociadas a la defensa en plantas contra patógenos; en este sentido, se evalúan también las enzimas involucradas en la síntesis de éstas, la acumulación de lignina, encafecimiento del tejido vegetal, producción de etileno o acumulación de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (GRHP) e inclusive la acumulación sistémica de inhibidores de proteasas (Dixon, 1986).

Respecto a la acción de los estimuladores abióticos se consideran como eventos no relacionados a la patogenésis y se cree que su mecanismo de acción es liberando o activando los estimuladores bióticos. Se ha estudiado el efecto de varios agentes químicos como estimuladores de fitoalexinas; por ejemplo, sales de metales pesados, cloroformo o detergentes. También algunas agentes físicos como la herida, congelamiento e irradiación con luz U.V. que inducen la acumulación de estos compuestos (Albersheim y Anderson, 1975; Bailey, 1982; Darvill y Albersheim, 1984).

Por otro lado, los estimuladores de origen biótico pueden estar involucrados en la interacción de las plantas y los patógenos potenciales. El

primer estimulador biótico estudiado fue la monilicolina A un pequeño péptido obtenido del micelio de *Monilinia fruticola* un patógeno de frutales. Se observó que estimuló la acumulación de fitoalexinas en vainas de frijol (*P. vulgaris* L.) y desde ese reporte se han caracterizado otros elicitores bióticos (Darvill y Albersheim, 1984).

De los estimuladores bióticos se pueden considerar a su vez dos grupos, por un lado, los de origen microbiano (principalmente fungal) y los de origen vegetal, también llamados estimuladores endógenos (Darvill y Albersheim, 1984; Ebel, 1986; Aldington y Fry, 1993).

En las plantas y hongos los carbohidratos son uno de los principales componentes de las paredes celulares y en la interacción microorganismo-planta éstos están involucrados en varios procesos que llevan a un reconocimiento mutuo. Las moléculas que se liberan de las paredes celulares vegetales cuando estas son dañadas son activas como estimuladoras y son oligosacáridos de naturaleza péctica liberados por la acción de las enzimas producidas por muchos hongos patógenos. El análisis de estos fragmentos indica un alto porcentaje de residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -1,4 y los de mayor actividad son los oligogalacturónidos de un grado de polimerización entre 9 y 13 (Hahn, 1981; Benhamou, 1990).

Las moléculas estimuladoras también pueden liberarse durante la invasión de patógenos fungales a la planta gracias a la acción de enzimas vegetales y pueden ser componentes de las superficies celulares microbianas, por ej. β -glucanos, ya que muchos hongos tienen estructuras de este tipo como elemento principal de su pared celular y se han reportado como potentes estimuladores de fitoalexinas (Cline et al., 1978).

2.6.1. ESTIMULADORES FUNGICOS

Las hidrolasas vegetales liberadas durante la invasión (glucanasas y quitinasas) pueden tener un doble papel, por un lado al actuar de una manera antimicrobiana directamente sobre los hongos degradando las paredes celulares de la hifas y por otro lado podrían indirectamente liberar fragmentos de las paredes fungales, con actividad estimuladora, conduciendo a una amplificación de la respuesta de defensa (Roulin et al., 1995).

El estimulador fúngico mejor caracterizado es el aislado del patógeno del frijol soya *Phytophthora megasperma var. sojae* cuya estructura mínima con actividad estimuladora se ha dilucidado, siendo un hepta- β -glucósido obtenido por hidrólisis ácida de la pared del hongo (Yoshikawa, 1983; Ebel, 1986; Dixon et al., 1994).

Keen en 1972 detectó que el medio extracelular de este hongo aplicado a hipocotilos de frijol soya estimuló la síntesis de la fitoalexina gliceolina; análisis posteriores indicaron que este medio está constituido básicamente por polisacáridos (Albersheim y Anderson, 1975), y al purificarlo por diversos métodos se concluyó que el fragmento estimulador básicamente está constituido por enlaces del tipo β -1,3 y β -1,6 (Darvill y Alberseim, 1984; Aldington y Fry, 1993).

En 1975 Anderson y Albersheim aislaron una fracción rica en glucanas de la pared celular del hongo patógeno del frijol *C. lindemuthianum* y reportaron que estimula la producción de fitoalexinas (faseolina, faseolidina, faseolinisoflavano y kievitona) en cotiledones e hipocotilos de frijol de la variedad Dark Red Kidney. El estimulador purificado está constituido principalmente por glucanos unidos por enlaces β -1,3 y 1,4.

Los dos sistemas anteriores, (*P. megasperma var sojae* y *C. lindemuthianum*) muestran como hongos patógenos son capaces de estimular los tejidos de sus hospederos e iniciar la síntesis de fitoalexinas (Albersheim y Anderson, 1975).

Posteriormente se empezó a evaluar la respuesta de defensa de las plantas a hongos no patógenos. Anderson (1978) utilizó 3 especies de *Colletotrichum* (dos no patógenos del frijol: *C. trifoli* y *C. destructivum* y el patógeno: *C. lindemuthianum*) y encontró que todas inducen la acumulación de fitoalexinas en frijol, determinando que en las glucanas residía dicha actividad estimuladora.

El aislamiento y caracterización de un estimulador de un extracto de la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* por Hahn y Albersheim en 1978, sugirió que la respuesta al estimulador forma parte de un mecanismo general de defensa de las plantas, o sea, un mecanismo que podría ser activado por una amplia variedad de microorganismos. El estimulador de levadura mostró una actividad considerable sobre la acumulación de gliceolina respecto a los controles en cotiledones e hipocotilos de frijol soya (Hahn y Alberseim, 1978).

Se han utilizado otras plantas para estudiar la estimulación de fitoalexinas; por ejemplo, la papa (*Solanum tuberosum*) fue sometida a glucanas de *Phytophthora infestans* y de levadura. En ambos casos se observó una acumulación de la fitoalexina rishitina. Estos dos estimuladores también se usaron en frijol variedad Red Kidney y se observó que con ambos tratamientos las plantas acumulaban las fitoalexinas faseolina, faseolidina, faseolinisoflavano y kievitona (Schaffrath et al., 1995).

Los datos reportados sugieren que al parecer el reconocimiento de las moléculas estimuladoras por las células vegetales depende básicamente de su estructura y se ha visto que con bajas concentraciones de tales estimuladores se estimulan las respuestas de defensa de las plantas (Schaffrath et al., 1995).

El reconocimiento de estas moléculas comunes a muchos hongos, principalmente oligo- β -glucanos, es entonces un importante factor en la respuesta de defensa de las plantas a la invasión de patógenos fúngicos (Cline et al., 1978).

Por otro lado, probablemente el estimulador fúngico y el de origen vegetal o endógeno, puedan liberarse simultáneamente al actuar las enzimas del hongo y de la propia planta, de manera coordinada durante el proceso de la interacción (Ebel, 1986). Esta posibilidad de sinergismo fue evaluada por Cano en 1993, utilizando un estimulador péptico de la pared del frijol y un oligoglucano de *C. lindemuthianum* y observó un notable incremento en la acumulación de faseolina en hipocotilos de frijol, casi tres veces mayor del encontrado al sumar los efectos de cada uno por separado.

Varios eventos se han propuesto para la transmisión de la señal generada por el reconocimiento del estimulador (fúngico o endógeno). Se ha propuesto la posibilidad de un receptor membranal, pero pocos avances existen sobre su caracterización y aislamiento. El papel del calcio como mediador en la señal, la depolarización de la membrana, procesos de fosfo y defosforilación, la mediación del etileno entre otros, están siendo estudiados; sin embargo, los elementos involucrados en la señal de transducción no se conocen aún en su totalidad (Dixon, 1986; Dixon et al., 1994).

2.7 RESISTENCIA INDUCIDA A PATOGENOS

En animales vertebrados es bien conocido el sistema inmune, inducible, antígeno-anticuerpo, que los defiende contra las enfermedades. Por el contrario es poco conocido el hecho de que las plantas pueden también inmunizarse contra patógenos que pueden enfermarlas; este fenómeno conocido como resistencia inducida o protección cruzada se puede definir como la resistencia que depende

de factores presentes después de que el huésped es desafiado por el patógeno (Sequeira, 1982; Enyedi et al., 1992).

La resistencia inducida en tejidos vegetales puede ser localizada o sistémica. La resistencia inducida sistémica se detecta en una zona distante al sitio de inoculación inicial y el término Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) fue propuesto por Ross en 1961 para describir un aumento en la resistencia a posteriores ataques del patógeno en partes inoculadas y no inoculadas de la planta (Enyedi et al., 1992); también propuso el término Resistencia Local Adquirida (RLA) para describir la resistencia inducida en áreas cercanas al sitio de inducción.

La resistencia adquirida (RA) se ha demostrado en muchas especies vegetales con un amplio espectro de resistencia que incluye virus, bacterias y muchos hongos fitopatógenos de importancia agronómica, preinoculando con cepas débilmente agresivas, avirulentas o formas incompatibles del organismo causal de la enfermedad (Kúc, 1982; Sutton, 1982; Leman et al., 1995)

El primer paso para el desarrollo de la RA es el reconocimiento de la infección patogénica por la planta; una vez que la planta reacciona al patógeno, son liberadas señales que disparan la resistencia en tejidos adyacentes o bien distantes (Ryals et al., 1994). Las plantas inoculadas tienen entre otras cosas un alto contenido de lignina respecto a las no inoculadas (Leman et al., 1995).

La resistencia adquirida fue estudiada por Chester desde 1933 postulando que dicha adquisición de resistencia en las plantas tiene un importante papel en su preservación en la naturaleza. Estudios en décadas posteriores a estas observaciones han generado la idea de que los mecanismos de inducción de resistencia pueden servir para desarrollar nuevas estrategias para la protección de cosechas o en cualquier estado de desarrollo de las plantas, como nuevos

métodos químicos o biológicos que estimulen los mecanismos de resistencia a la enfermedad (Ward et al., 1991; Ryals et al., 1994).

La inducción de resistencia se ha ensayado con agentes químicos que no causan reacción visible, como por ejemplo al inyectar ácido acetil salicílico o asperjando ácido isonicotínico (AIN) en hojas de tabaco, que dio por resultado la protección de la planta al virus del mosaico del tabaco (TMV)(Métraux et al., citado por Hoffland, 1995).

Se han considerado varias respuestas para la evaluación de la resistencia, por ejemplo los grados de lesión en tejidos observados después del desafío, producción de proteínas relacionadas a la patogenésis, lignina, peroxidasas o proteasas; todas estas relacionadas a la resistencia sistémica y para la resistencia local principalmente la acumulación de fitoalexinas.

Kúc et al (1982) fue el primero que reportó la adquisición de resistencia en pepino previamente inoculando con un patógeno inductor de necrosis; de sus observaciones se sabe que hay una reducción de la penetración eficiente del inóculo desafiante y un aumento en la tasa de lignificación en la zona desafiada y de la peroxidasa (Hoffland et al., 1995).

Ye et al (1989) indujeron resistencia en tabaco utilizando como estimuladores la aspirina y detectaron proteínas relacionadas a la patogenésis en hojas y tallos de tabaco inducidos con aspirina. También reportaron que las lesiones no se extendieron al desafiar con el virus del mosaico del tabaco TMV y *P. tabacina*. Las plantas que preinoculadas con TMV fueron desafiadas con el hongo y las plantas pretratadas con el hongo se desafiaron con el virus; en ambos tratamientos se observó una reducción en el tamaño de las lesiones respecto a los controles tratados con agua.

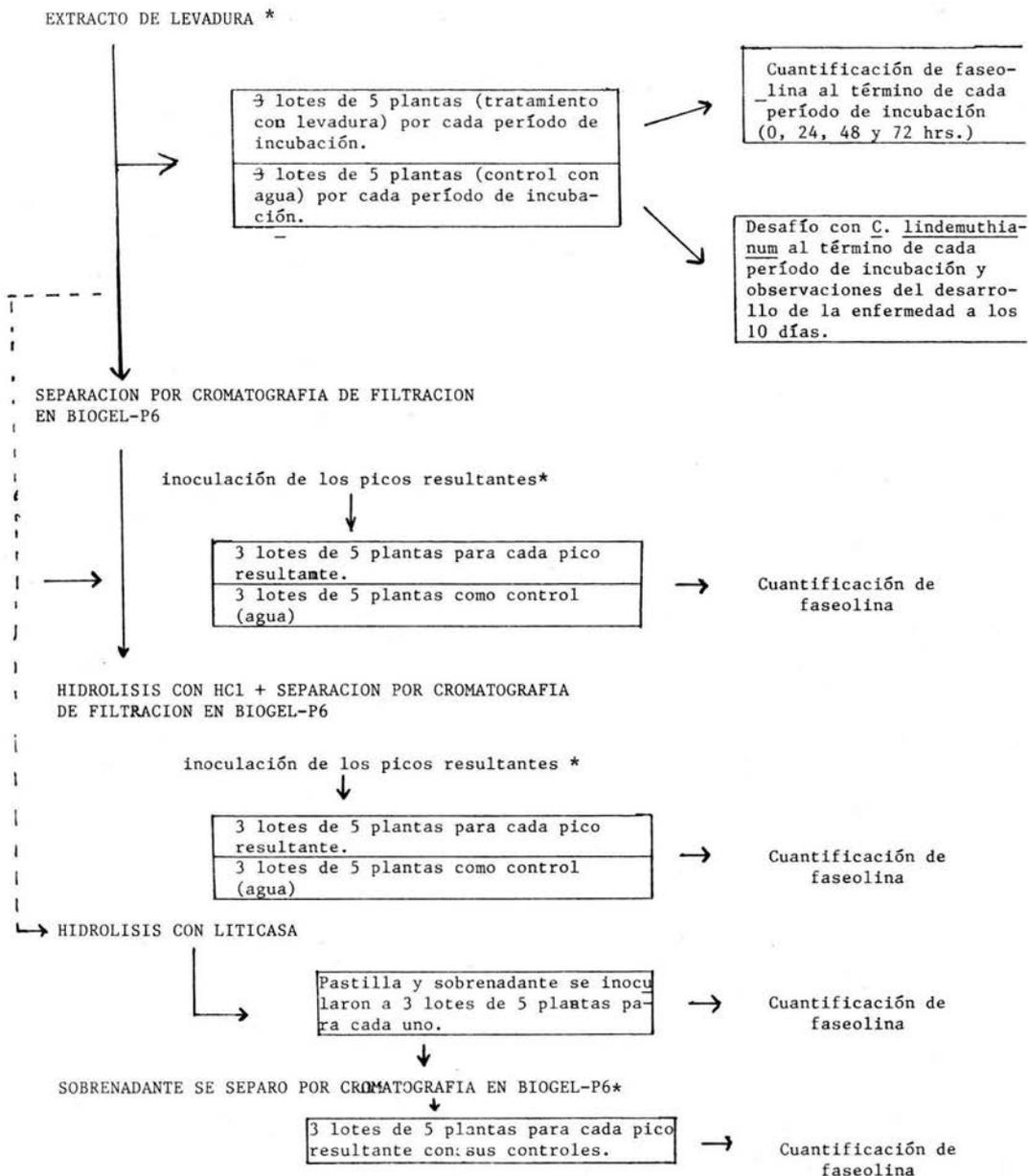
2.7.1. RESISTENCIA INDUCIDA A NIVEL LOCAL

Por lo general en respuesta al estimulador de la resistencia se produce necrosis gradual del tejido inducido. Una aparición rápida de la respuesta hipersensible (RH) se correlaciona con una rápida inducción de fitoalexinas a nivel local (Smith et al., 1991).

Chávez en 1992 ensayó un método de control biológico en frijol (flor de mayo) utilizando un estimulador del patógeno de esta especie (*C. lindemuthianum*) y el de un no patógeno del frijol (*Phytophthora boehmeriae*); en este estudio se encontró que las plantas que recibieron el pretratamiento resistieron el desafío con el patógeno respecto a las que no fueron tratadas, asociando esta respuesta a la aparición de la RH. Inoculaciones repetidas con el estimulador de *C. lindemuthianum* proporcionaron resistencia hasta la formación de vainas, las cuales al ser desafiadas con el patógeno tuvieron menos lesiones respecto a las no preinoculadas

Se ha observado que la protección puede ser efectiva contra un amplio rango de patógenos y puede permanecer por algunas semanas o meses posteriores a la inducción con el estimulador. El pretratamiento de cultivos agrícolas importantes, para activar sus mecanismos de defensa e inducir resistencia a enfermedades podría ser una atractiva práctica de control.

METODOLOGIA



* indica las muestras que se analizaron en cromatografía descendente en papel para la identificación de azúcares.

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El hongo *Colletotrichum lindemuthianum* raza K fue proporcionado por el cepario del Laboratorio de Bioquímica Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la U.M.S.N.H.

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Flor de Mayo se obtuvieron de cultivos de cosecha reciente de la región.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1. GERMINACION DE SEMILLAS

Se realizó una selección minuciosa de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Flor de Mayo descartando las que presentaron roturas y maltrato. Se lavaron con una solución de extrán al 3% durante 3-5 minutos y se enjuagaron con agua de la llave, posteriormente se trataron con cloro comercial (clorox) al 10% durante 3-5 minutos y se enjuagaron abundantemente con agua destilada estéril, manteniéndose por tres días entre capas de algodón húmedo estéril en una estufa Felisa mod 132 a una temperatura constante de 30°C en oscuridad.

3.2.2 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS HIDROPONICOS

Se usó agrolita como soporte para el establecimiento de cultivos hidropónicos, lavada y esterilizada a 121°C a 1.5 kg/cm² de presión por 20 minutos en una autoclave (Hirayama) Mod. HA-M II. Una vez concluido el tiempo

de germinación de las semillas, se transfirieron las semillas germinadas a macetas con agrolita en contenedores plásticos en una cámara de cultivo de plantas con fotoperíodo 12 hrs luz/12 hrs oscuridad y temperatura de 24-28°C.

Las plantas de frijol fueron regadas diariamente con una solución nutritiva publicada por Soriano y Medina en 1989 (Ver apéndice).

3.2.3. MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE *Colletotrichum lindemuthianum*.

Se realizaron resiembras semanales para mantener en óptimas condiciones al hongo en medio sólido ejote-papa-dextrosa-agar (EPDA) (ver apéndice), se creció a 23-25°C en una cámara (Ambi-hi-lo-chamber) de Lab Line y se mantuvieron las cepas en refrigeración a 4-5°C para su conservación. Se creció el hongo en medio líquido papa-dextrosa (PD) (ver apéndice) a 100 rpm a 26°C en un baño de agitación (Lab Line) y obtener el micelio en suspensión para las pruebas de desafío en plántulas de frijol (Farías, 1986).

3.2.4. OBTENCION DE LA FRACCION ESTIMULADORA DE *S. cerevisiae*

20 gr de autolizado de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) BIOXON se disolvieron en 100 ml de agua desionizada estéril y 100 ml de etanol comercial al 80% utilizando un agitador magnético marca (Corning) PC-353, la mezcla se refrigeró por 4 días y al término de este período se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió nuevamente en 100 ml de agua desionizada estéril y 100 ml de etanol comercial al 80% y se guardó por 4 días en refrigeración; descartándose el sobrenadante y disolviendo el precipitado final en 80 ml de agua desionizada estéril. Esta fracción (denominada fracción cruda) fue utilizada para las pruebas de inducción de resistencia y estimulación de faseolina en hipocotilos de frijol (Hahn, 1978). La fracción cruda de levadura obtenida por precipitación se sometió a cromatografía de filtración en Biogel-P6 (Biorad) 1 x 132 cm equilibrada y eluída con agua desionizada colectada en fracciones de 2

ml en un colector (Fractomete Alpha 200, Searle). Del perfil de elución obtenido se agruparon las diferentes fracciones y de cada una se probó su actividad inductora de faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol.

Hidrólisis química de la fracción cruda. El precipitado de levadura (fracción cruda) fue hidrolizado con 2 ml de HCl 2M por tres horas en baño de agua hirviendo, al término del tiempo de hidrólisis se neutralizó la mezcla con 1 ml de NaOH 4M. El hidrolizado se sometió a cromatografía de filtración en Biogel-P6 en una columna de 1 x 132 cm equilibrada y eluída con agua desionizada. Se agruparon varias fracciones en base a el perfil de elución las cuales se probaron para inducir faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol.

Hidrólisis enzimática de la fracción cruda. Se partió de la fracción obtenida de la precipitación con etanol, la cual se dializó contra agua destilada por 24 hrs. Se tomaron 5 mg y se resuspendieron en 300 μ l de amortiguador $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 50 mM pH 6.5 y se adicionaron 300 μ l de liticasa (β ,1-3-glucanasa) disuelta en el amortiguador ya mencionado, a una concentración de 0.1 mg/ml. Se incubó la mezcla en obscuridad a 30°C durante 24 hrs, se detuvo la reacción colocando la muestra en agua hirviendo durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante del residuo por centrifugación de la mezcla de incubación a 4500 rpm durante 5 minutos. La actividad estimuladora de faseolina en el sobrenadante y en el precipitado se ensayó en hipocotilos de frijol. Por otro lado, el sobrenadante se sometió a cromatografía de filtración en biogel-P6 en columna de 1 x 132 cm equilibrada y eluída con agua desionizada y las fracciones obtenidas se agruparon para probar su actividad estimuladora de faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol (Zavala, 1993).

3.2.5. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

Se utilizó el método de la antrona, a 0.5 ml de la solución problema contenida en un tubo de ensaye de 10 ml se le agregaron cuidadosamente 2 ml del reactivo de antrona (0.05 gr de antrona + 25 ml de H₂SO₄ concentrado) formándose dos estratos; se mezcló en un Vórtex (Sybron-Thermolyne), los tubos de ensaye se cubrieron con papel aluminio para evitar pérdidas de agua por evaporación al calentarlos en baño de agua hirviendo por 10 min. Una vez enfriados a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 620 nm contra un blanco en un espectrofotómetro (Beckman-DU 600). Se realizó una curva patrón de glucosa (0-100 µg) para determinar la concentración de las muestras las cuales se reportan en equivalentes de glucosa (Plummer, 1981; Chávez, 1992).

Cromatografía descendente en papel. Se utilizaron muestras de la fracción cruda y de las fracciones obtenidas en el perfil de elución al filtrar en Biogel-P6 la fracción cruda, hidrolizada con HCl e hidrolizada con liticasa. Como soluciones patrón se usaron la glucosa y manosa al 50%. Sobre hojas de papel Wathman No. 1 de 23 x 50 cm, se trazó una línea a 8 cm del borde superior y sobre ésta se aplicaron alícuotas de las muestras espaciadas entre sí cada 3 cm. aproximadamente. Se secaron y doblaron adecuadamente fijando el extremo de la hoja con varillas de vidrio dentro de cubetas que se colocaron en la parte superior de la cámara para cromatografía (Pyrex)(50 x 70 cm).

Se corrieron las muestras bajo el sistema de solventes: Isopropanol: acetato de etilo: agua: piridina (14:26:7:2) durante 24 hrs aproximadamente. Una vez que transcurrió este tiempo las hojas se secaron perfectamente bajo una campana extractora de gases y se revelaron asperjando uniformemente una solución reveladora de plata, la cuál se preparó a partir de .1 ml de AgNO₃ 66% (p/v) diluido en 20 ml de acetona. Las hojas se secaron bajo la campana extractora y se colocaron en un horno a 100°C por 10 min. Las manchas para

cada muestra se detectaron obteniendo su valor de Rf y comparándolo con el Rf de las soluciones patrón (Plummer, 1981; Chaplin, 1986).

3.2.6. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE FASEOLINA

Plántulas de frijol mantenidas en condiciones de hidroponia de 6 a 7 días de edad o cuando el primer par de hojas estuvieron completamente extendidas, fueron inoculadas en el hipocotilo aproximadamente a 1 cm del nudo cotiledonar realizando una herida pequeña con una aguja estéril. Posteriormente se aplicó la fracción de levadura a una concentración de $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en equivalentes de glucosa (Curva dosis-respuesta, donde se probaron diferentes concentraciones del extracto de levadura evaluando la mayor acumulación de faseolina).

Los lotes de plantas tratadas se mantuvieron a diferentes períodos de incubación (0, 24, 48 y 72 hrs) para la fracción cruda y 24 hrs para las fracciones obtenidas al someter a cromatografía de filtración la fracción cruda, la tratada con HCl y la tratada con liticasa. De las plantas inoculadas se extrajo y cuantificó la fitoalexina faseolina. Cortes de hipocotilo de 2 cm de longitud de lotes con 5 plantas se cortaron de modo que la herida de inducción quedó en la parte media del segmento cortado. Se pesaron los fragmentos de tejido, se homogeneizaron en un mortero con etanol al 95% en frío (10 ml/g), se filtro en papel Whatman No. 2 y se secó al vacío en un rotavapor (Büchi RE 111) con baño a 30°C.

Se recuperó el residuo en 20 ml de una mezcla de acetato de etilo y agua 1:1 (v/v) pasándose a un embudo de separación donde se extrajo la fase orgánica. La fase acuosa se lavó dos veces más con acetato de etilo. Se reunieron las tres partes orgánicas y el exceso de agua se removió con sulfato de sodio anhidro durante 15 minutos; se filtró y evaporó al vacío a 30°C. El residuo se recuperó en $500 \mu\text{l}$ de acetato de etilo y fue aplicado a placas para cromatografía de capa fina de gel de sílice (.25 mm de espesor y 5 x 20 cm) con

indicador fluorescente F-254; se corrieron las cromatografías bajo el sistema de solventes cloroformo-metanol 25:1 (v/v). Al término del corrimiento se revelaron las placas con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) con una lámpara UVS-12 Ultraviolet Lamp, Short Wave. UV. Prod. Inc., la banda de faseolina se identificó de acuerdo a su valor de Rf (Bailey, Mansfield, 1982).

Se raspó la banda de faseolina del gel de cada placa en un embudo sobre jeringas de plástico empacadas con algodón en la punta y el gel depositado sobre el algodón se eluyó con 6 ml de etanol destilado. La muestra eluida se leyó a una absorbancia de 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman-DU 600). Se calculó la concentración usando el valor obtenido, el coeficiente de extinción molar (9800) y el peso fresco del tejido. La concentración de faseolina se expresó como μg de faseolina/g de peso fresco.

3.2.7. RESISTENCIA INDUCIDA A *Colletotricum lindemuthianum*

El hongo fue crecido en medio líquido papa-dextrosa por una semana en baño de agitación y el micelio fue homogeneizado en un mortero estéril y resuspendido en el mismo caldo, para realizar con este inóculo los ensayos de desafío.

Las plántulas de frijol (*P. vulgaris* L.) cv. flor de mayo para este ensayo se inocularon con la fracción cruda de la levadura como ya se describió, a una concentración de $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en equivalentes de glucosa. Una vez inducidas con la fracción cruda de la levadura se mantuvieron durante diferentes períodos de tiempo (0, 24, 48, 72 hrs) y al término de cada uno de estos períodos de incubación, las plántulas fueron desafiadas con el hongo fitopatógeno tomando una asada del inóculo sobre una pequeña herida cercana al sitio de inducción. Los tratamientos control fueron inoculados con $5 \mu\text{l}$ de agua destilada estéril, incubados y desafiados bajo las mismas condiciones.

Cada lote de plantas fue cubierto con bolsas plásticas para aumentar la humedad relativa durante la incubación con el hongo y mantenidas en el cuarto de crecimiento. Las observaciones de lesiones se realizaron aproximadamente a las dos semanas posteriores a la prueba de desafío usando la tabla propuesta por Chávez (1992). Ver apéndice.

4. RESULTADOS

4.1 ACTIVIDAD DE LA FRACCION CRUDA DE LEVADURA

La primer prueba que se realizó al obtener la fracción cruda de levadura fue sobre su actividad estimuladora de faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol, ajustando la concentración a $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en equivalentes de glucosa. Se obtuvo una curva de acumulación de la fitoalexina con mediciones contra tiempo a 0, 24, 48 y 72 horas en plantas tratadas con el estimulador y plantas control inoculadas con $5 \mu\text{l}$ de agua (Figura 1).

En la gráfica se puede observar como en las plantas control los niveles basales de faseolina (53.75 ± 1.82) se mantienen casi sin variación durante el período evaluado, en tanto que en las plantas tratadas con el estimulador en la medición de 0 horas la concentración no se incrementó de manera importante, ya que el nivel fue de $59.7 \mu\text{g}/\text{gpf}$ comparado con su control de $56.8 \mu\text{g}/\text{gpf}$. Después de 24 horas de incubación en las plántulas tratadas el valor de faseolina de $158.4 \mu\text{g}/\text{gpf}$ es casi tres veces más al encontrado a ese mismo período de tiempo en las plantas control. Sin embargo, este aumento fue transitorio ya que el nivel de la faseolina aún así descendió de manera considerable hacia las 48 horas en las plantas estimuladas; aún así, la concentración estuvo por arriba de la concentración del control en este período de tiempo. Por otro lado, la cuantificación de la fitoalexina a las 72 hrs muestra que si bien los niveles de faseolina de las plantas estimuladas con la levadura se mantuvieron por encima de la concentración cuantificada en las plantas control, habrían disminuido a cerca del valor inicial en las plantas tratadas.

En la tabla 1 se resume la concentración neta estimulada de faseolina al restar los valores basales de las plantas control. Como puede verse las plantas respondieron al extracto de levadura dentro de las 24 horas después de tratadas, de manera considerable, aunque posteriormente mostró una tendencia a recuperar los niveles iniciales.

4.2 ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE FRACCIONES DEL EXTRACTO DE LEVADURA

Una vez determinado el tiempo óptimo de acumulación de faseolina con el extracto que fue de 24 hrs, la fracción cruda de levadura se sometió a una separación por cromatografía de filtración en Biogel-P6 y se evaluó la respuesta de las plantas a los grupos de fracciones obtenidos del perfil de elución, a los que previamente se les determinó el contenido de azúcar por el método de la antrona en equivalentes de glucosa. Se prepararon 3 grupos principales los cuáles se designaron como picos I (fracciones 7 a 23), II (fracciones 24 a 38) y III (fracciones 39 a 60) (Figura 2).

A las fracciones combinadas en cada uno de estos grupos se les ajustó la concentración en equivalentes de glucosa ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se les midió actividad estimuladora de faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol. En la figura 3 se esquematiza la actividad estimuladora para cada uno de estos picos después de 24 hrs de incubación. Si bien los 3 picos evaluados presentaron actividad, la mayor acumulación de faseolina la presentó el pico II con un valor de $95.8 \mu\text{g}/\text{gpf}$ y un incremento neto de $35.1 \mu\text{g}/\text{gpf}$ sobre el nivel basal.

Como se observa en el perfil de elución el pico II está en el volumen incluido de la columna y agrupa moléculas menores de 6000 Daltons, es decir está en el rango de oligómeros, en tanto que el pico I que corresponde a cadenas más grandes ($> 6000 \text{ D}$) presentó poca estimulación sobre la concentración de faseolina. El pico III que correspondería a cadenas más pequeñas e inclusive monómeros también tuvo actividad, pero esta fue menor que la encontrada para el pico II.

4.3 ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE FRACCIONES DEL EXTRACTO DE LEVADURA DESPUES DE HIDROLISIS ACIDA

La fracción cruda de levadura hidrolizada con HCl 2M fue sometida a una separación por cromatografía de filtración en Biogel-P6. La figura 4 muestra el perfil de elución encontrado en el que se observan 3 picos principales llamados **HI**, **HII**, y **HIII**, que agrupan las fracciones 7-19, 20-41, y 42-60 respectivamente. Cada grupo de fracciones combinadas se ajustó a la concentración empleada en todas las pruebas (0.15 μg de azúcar en equivalentes de glucosa/ μl) aplicando 5 μl a cada hipocotilo de plántulas de frijol. La respuesta de acumulación de faseolina se evaluó a las 24 hrs y se muestra en la figura 5. La actividad fue muy parecida para los picos **HII** y **HIII** (99.82 y 106.8 $\mu\text{g/gpf}$ respectivamente) en tanto que el tratamiento con las fracciones del pico **HI** no mostraron diferencia con los niveles basales.

La acción de la hidrólisis se reflejó en el incremento de la absorbancia para el grupo de azúcares dentro del rango de cadenas pequeñas y monómeros (**HIII**), a costa de los polímeros del grupo **I**. En el caso del grupo de oligómeros de tamaño medio (**HII**) éstos no incrementaron en cantidad por la hidrólisis. Asimismo, hubo un cambio en el comportamiento de las fracciones, toda vez que desapareció la actividad del grupo **I**, favoreciendo al grupo **III** que superó al grupo **II** en capacidad estimuladora.

4.4 HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA FRACCION CRUDA DE LEVADURA

La fracción cruda de levadura sometida a hidrólisis enzimática con la liticasa, fue centrifugada y separado el sobrenadante y la pastilla para determinar en que fracción radicaba la actividad estimuladora. Se ensayaron en hipocotilos de plántulas de frijol aplicando la concentración referida en los otros tratamientos y evaluando la respuesta a las 24 hrs. En la tabla 2 se resumen los resultados encontrados, que muestran que la mayor actividad se encontró en el

sobrenadante con una concentración neta estimulada de 37.5 $\mu\text{g/gpf}$, mientras que en la pastilla la acumulación neta fue de apenas 13.1 $\mu\text{g/gpf}$.

Una vez que se determinó que en el sobrenadante residía la actividad estimuladora, éste se fraccionó en una columna de filtración de Biogel-P6 resultando el perfil de elución que se muestra en la figura 6. Se observaron 5 grupos principales que se designaron como a, b, c, d y e que agrupan las fracciones 7-22, 23-28, 29-34, 35-41 y 42-60 respectivamente. Los oligómeros de tamaño intermedio quedaron separados entre los picos (b-d).

La actividad estimuladora de faseolina de cada grupo se presenta en la figura 7, que muestra que todos ellos presentan actividad pero predomina en los picos b, c y d (81.1, 96.5 y 98.5 $\mu\text{g/gpf}$ respectivamente).

4.5 CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE LAS FRACCIONES DEL ESTIMULADOR DE LEVADURA.

Las fracciones que se separaron en Biogel-P6 del extracto crudo y los hidrolizados enzimático o ácido se sometieron a un análisis en cromatografía en papel para identificar los azúcares presentes, también se incluyó la fracción cruda de levadura así como cada uno de los grupos (I, II, III, HI, HII, HIII y a, b, c, d, e). En la tabla 3 se marca la presencia o ausencia de dos azúcares (glucosa y manosa) que se incluyeron como patrón. Se compararon los valores de Rf de las muestras problema y patrón que se resumen en la tabla A2 (ver apéndice).

Las manchas que resultaron al revelar las muestras de la fracción cruda, I, II, III, HI, HII y HIII indican la presencia de glucosa; sin embargo no hubo una clara separación que revelara la presencia de manosa, muy probablemente este azúcar esté presente ya que el gran tamaño de la mancha revelada podría enmascarar su presencia, sobre todo porque la técnica utilizada para el análisis de los azúcares no es lo suficientemente sensible para discriminarla de la glucosa. Lo que dificultó la identificación de la manosa en las muestras, denotándose como (*) probable su presencia.

Se identificó un tercer azúcar en la fracción cruda, en el pico III y en el pico HIII como una mancha grande con un Rf cercano a 0.5, también se detectó en el pico II pero en menor cantidad.

Respecto a las fracciones a, b, c, d y e solo se detectó la presencia de glucosa puesto que estas muestras provienen de la hidrólisis enzimática con una glucanasa.

4.6 INDUCCION DE RESISTENCIA A LA ANTRACNOSIS

Las plántulas de 7 días de edad que se inocularon en el hipocotilo con la fracción cruda de levadura, se mantuvieron a 4 períodos de incubación (0, 24, 48 y 72 hrs) y para evaluar la resistencia local inducida por el tratamiento los

lotes de plantas fueron desafiadas con el hongo fitopatógeno del frijol *Colletotrichum lindemuthianum*

Las observaciones finales de las lesiones en las plantas se tomaron aproximadamente a los 10 días de ser desafiadas en base al cuadro propuesto por Chávez (1992) donde se definen 4 grados de lesión que van de poco daño por la presencia de Reacción Hipersensible (grado 0), daño moderado (grado 1) daño severo y daño profundo o muerte de la planta (grados 2 y 3)(ver cuadro AI, apéndice).

En la Figura 8 se muestran los resultados de la prueba de desafío a las 0 hrs de inducción con el estimulador y se gráfica el porcentaje de plantas control (inoculadas con agua) y tratadas correspondientes a cada grado de lesión. Se encontró que un mayor porcentaje de plantas mostró grados de lesión severo en ambos tratamientos en tanto que ninguna permaneció sana. Se observó que en general pocas plantas presentaron reacción hipersensible, siendo de 12% y 5% para plantas control y tratadas respectivamente. Puede decirse que en cada grupo tanto las plantas control como las tratadas se comportaron de manera similar.

El período de incubación de 24 hrs con el extracto de levadura que se muestra en la figura 9 indica un mayor porcentaje de plantas tratadas que permanecieron sanas, es decir, un 68% de las plantas mostró un grado de lesión 0 contra un 0% de plantas control que recibieron en lugar del extracto de levadura 5 μ l de agua. En los lotes control la mayoría de las plantas sufrieron daño severo después de la inoculación con el patógeno, llegando incluso a la muerte (49% para grado 2 y 41% para grado 3) en tanto que solo un 10% tuvo daño moderado (grado 1). Por el contrario las plántulas que como pretratamiento recibieron la inoculación de la fracción cruda de levadura y se inocularon por 24 horas tuvieron un comportamiento inverso, ya que solo un 10% de plantas murieron (grado 3) y los porcentajes de plantas con daño medio y severo también se redujo (15 y 17% respectivamente).

Respecto a los resultados para el período de 48 horas de incubación con el extracto se encontró que el número de plantas que permanecieron sanas fue

menor que el caso de 24 horas, ya que se observó solo un 41% para el grado 0 de lesión. Asimismo se incrementaron los porcentajes de plantas con daño medio, severo y profundo (grado 1, 2 y 3) que alcanzaron en total un 59%. Sin embargo, las plantas que murieron solo aumentaron de 10 a 15% y se encontró diferencia en general, a las plantas control, que al igual que en los dos experimentos anteriores mostraron que muy pocas plantas resisten la enfermedad y los mayores porcentajes caen dentro del rango de daño severo y profundo.

A las 72 horas continuó la tendencia en las plantas tratadas a una disminución en el número de plantas sanas, ya que del porcentaje encontrado a las 24 horas bajó a menos de la mitad, con sólo 31% de sanas. Además se observó una elevación de plantas pretratadas con el extracto de levadura que llegaron a daño severo o muerte. No obstante las plantas con daño moderado predominan sobre esas últimas (33%). Sin embargo, en contraste a los lotes control, aún para este período hay un 26% más plántulas comprendidas en grado 0 en los lotes pretratados con la levadura.

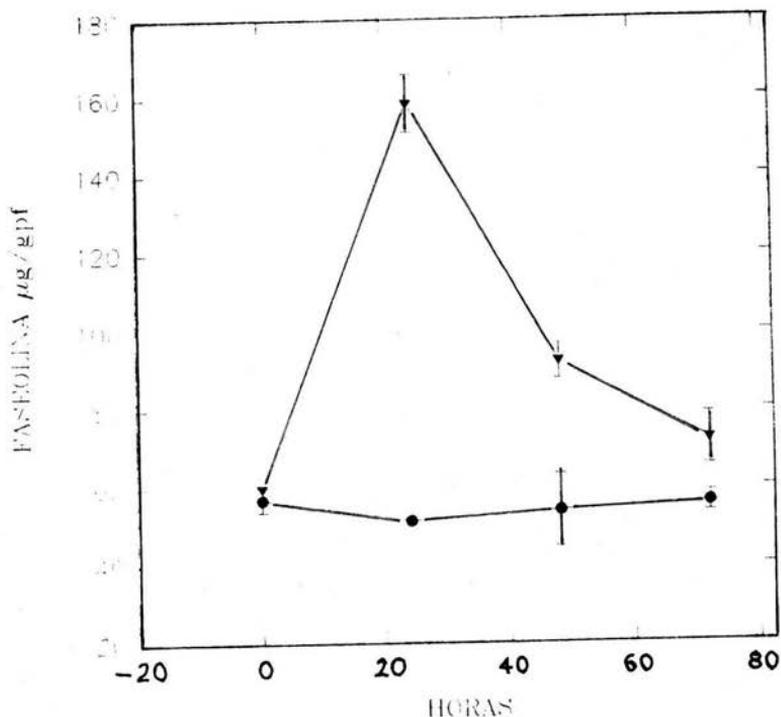


FIGURA 1. Cinética de acumulación de faseolina en plántulas de frijol inoculadas con extracto crudo de levadura. Plántulas de frijol de 7 días de edad fueron inoculadas con el extracto crudo de levadura ($0.15\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aplicando $5\mu\text{l}$ por hipocotilo e incubadas a 0, 24, 48 y 72 horas. Al término de cada período de incubación se cosecharon los hipocotilos, cuantificándose la concentración de faseolina. Los controles recibieron agua destilada en lugar de extracto de levadura. \blacktriangle tratadas, \bullet control (promedio de 3 muestras con desviación estandar).

TABLA 1. Producción neta de faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol en respuesta al extracto de levadura.

INCUBACION CON EL EXTRACTO (horas)	FASEOLINA ESTIMULADA ($\mu\text{g/gpf}$)*
0	2.92
24	106.55
48	38.44
72	16.66

***Se restaron los niveles de faseolina encontrados en las plantas no estimuladas (control) para cada período de tiempo. La cuantificación se realizó por triplicado y cada muestra constó de 5 plantas.**

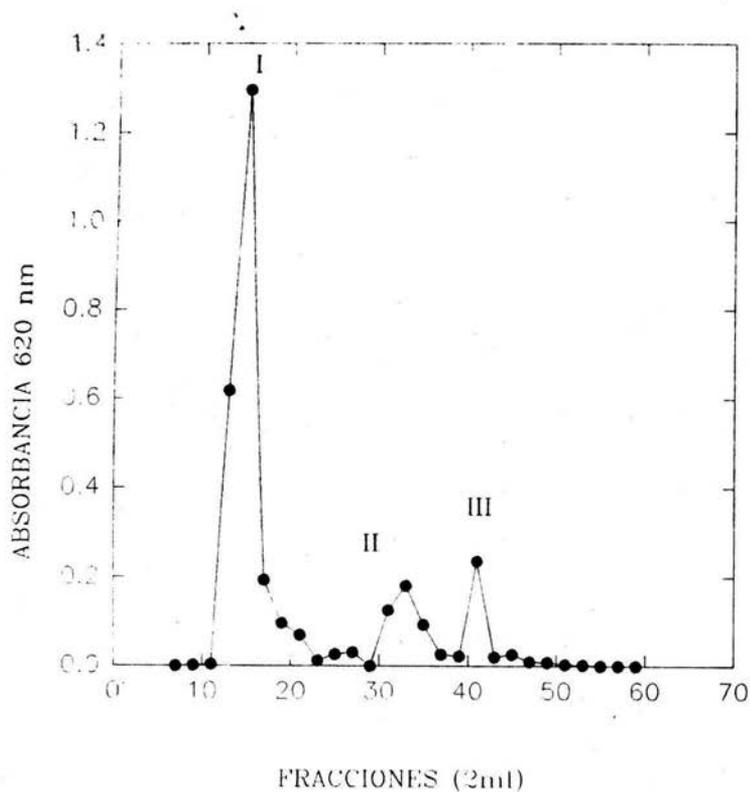


FIGURA 2. Perfil de elución de la fracción cruda de levadura separada por cromatografía de filtración. La fracción cruda de levadura fue separada en una columna de Biogel-P6 (1x132 cm) y eluída con agua desionizada en fracciones de 2ml. Se determinó la concentración de azúcares de las fracciones por el método de la antrona en equivalentes de glucosa. Las fracciones se agruparon en 3 picos principales llamados I, II y III.

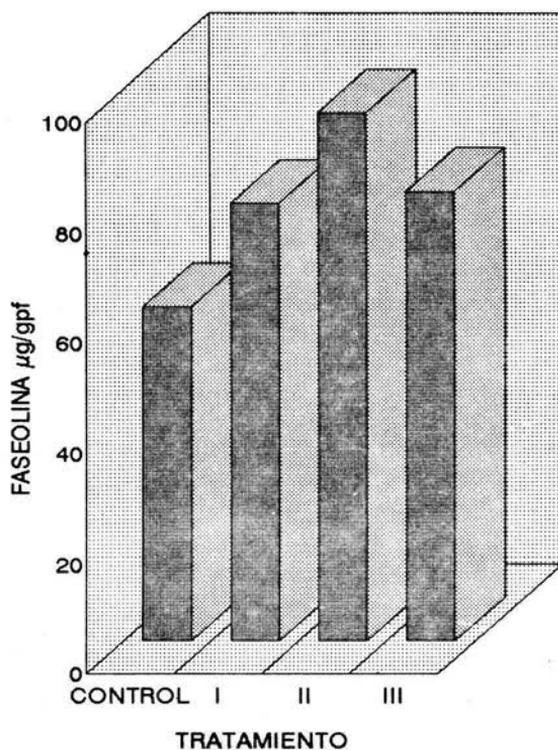


Figura 3. Estimulación de faseolina por las fracciones del extracto crudo de levadura obtenidas de la separación en Biogel-P6. Plántulas de 7 días de edad fueron inoculadas con las fracciones I, II y III ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenidas de la filtración en Biogel-P6 ($1 \times 132 \text{ cm}$) aplicando $5 \mu\text{l}$ por hipocotilo e incubando por 24 horas. Al término del período de incubación se cosecharon los hipocotilos, cuantificándose la concentración de faseolina. Los controles recibieron agua destilada.

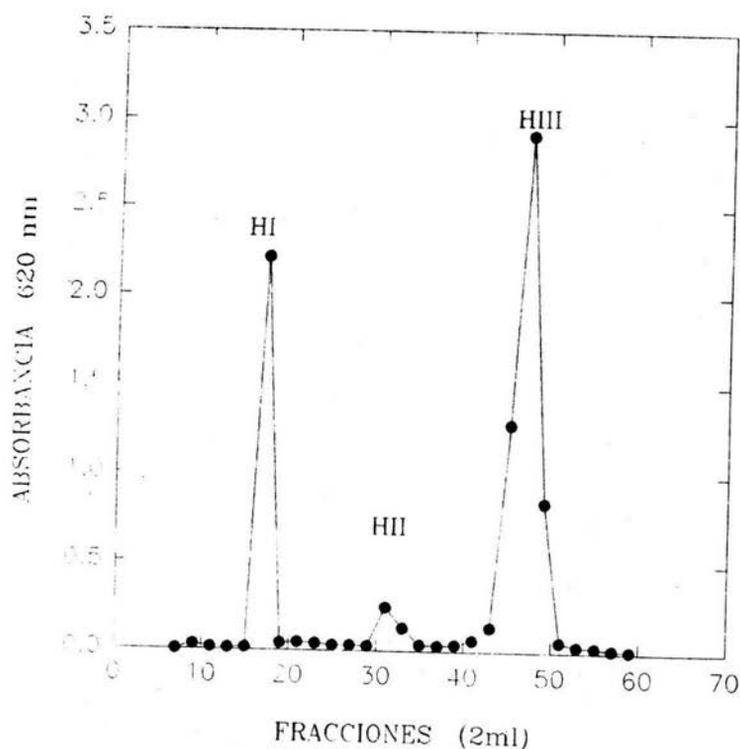


Figura 4. Perfil de elución de la fracción cruda de levadura hidrolizada con ácido separada por cromatografía de filtración. La fracción cruda de levadura hidrolizada con HCl 2M fue separado por filtración en Biogel-P6 (1x132 cm) y eluida con agua desionizada, colectándose fracciones de 2 ml. Se determinó la concentración de azúcares de las fracciones por el método de la antrona, en equivalentes de glucosa. Las fracciones se agruparon en 3 picos principales llamados HI, HII y HIII.

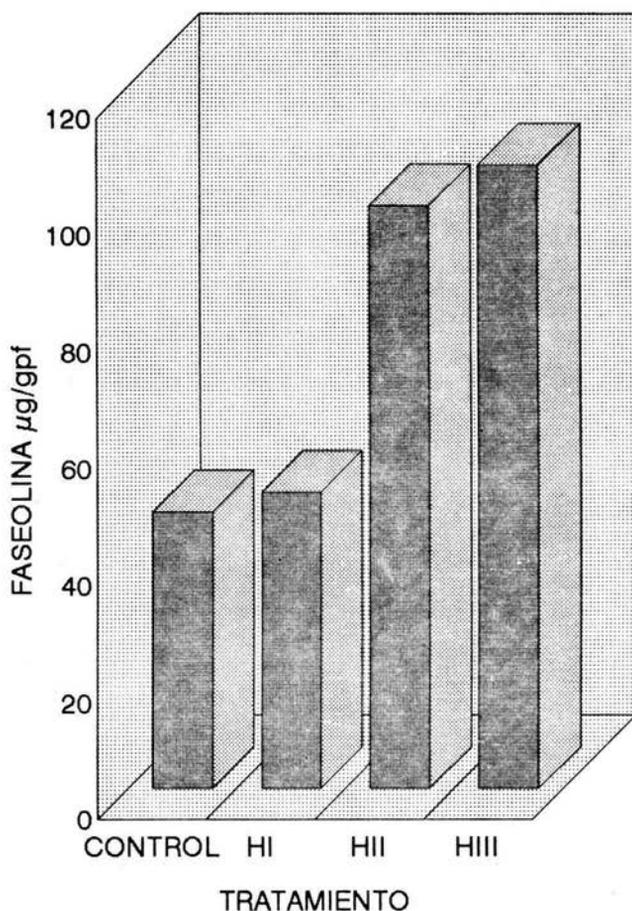


Figura 5. **Estimulación de faseolina por las fracciones del extracto de levadura hidrolizado con ácido obtenidas por filtración en Biogel-P6.** Plántulas de 7 días de edad fueron inoculadas con las fracciones HI, HII y HIII ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenidas de la filtración en Biogel-P6 ($1 \times 132 \text{ cm}$) aplicando $5 \mu\text{l}$ por hipocotilo e incubando por 24 horas. Al término del período de incubación se cosecharon los hipocotilos, cuantificando la concentración de faseolina. Los controles recibieron agua destilada.

Tabla 2. Actividad estimuladora de faseolina del hidrolizado con liticasa de la fracción cruda de levadura.

TRATAMIENTO	FASEOLINA ($\mu\text{g/gpf}$)*
SOBRENADANTE	80.31
PASTILLA	55.94
CONTROL (AGUA)	42.80

5 mg de muestra de la fracción cruda de levadura resuspendida en $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 50 mM pH 6.5 se sometió a digestión enzimática con 300 μl de liticasa. Se incubó a 30°C por 24 horas, se detuvo la reacción por calentamiento y se centrifugo la mezcla a 4500 rpm/5min. Se evaluó la actividad estimuladora del sobrenadante y de la pastilla ajustando a 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y aplicando a hipocotilos de plántulas de frijol de 7 días de edad. Se cosecharon los hipocotilos después de 24 horas de incubación, cuantificando la concentración de faseolina. *Acumulación sobre valores control.

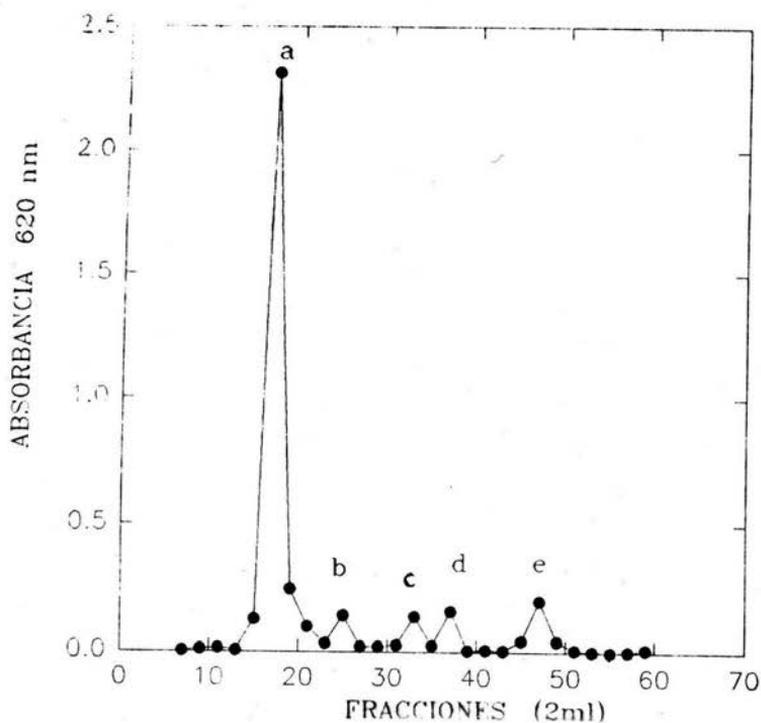


Figura 6. Perfil de elución del extracto crudo de levadura hidrolizado con liticasa separado por cromatografía de filtración en Biogel-P6. La fracción soluble (sobrenadante) de la hidrólisis enzimática de la fracción cruda de levadura que tuvo actividad estimuladora de faseolina (ver tabla 2) fue separada por filtración en Biogel-P6 (1x132 cm) y eluída con agua desionizada, colectándose fracciones de 2 ml. Se determinó la concentración de azúcares de las fracciones por el método de la antrona, en equivalentes de glucosa. Las fracciones se agruparon en 5 grupos principales llamados a, b, c, d y e.

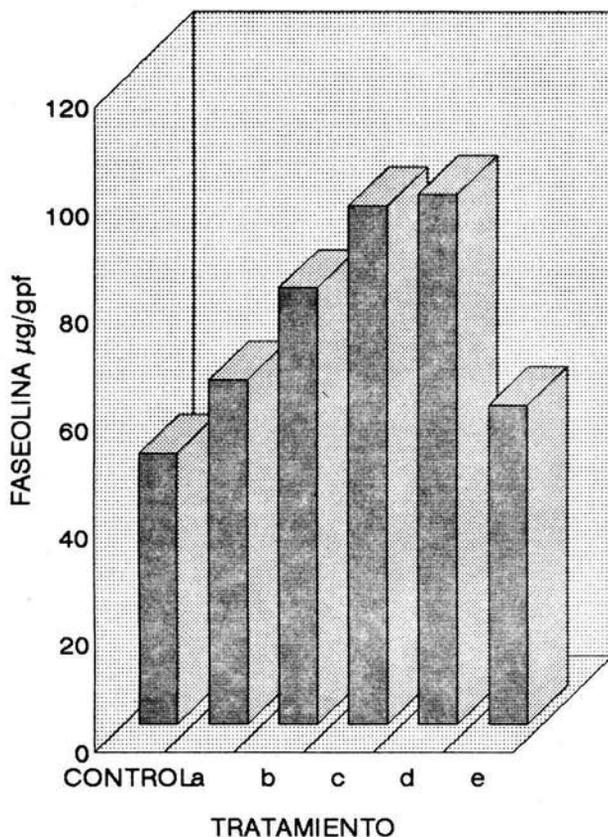


Figura 7. Estimulación de faseolina por las fracciones del extracto de levadura hidrolizado con liticasa obtenidas por filtración en Biogel-P6. Plántulas de 7 días de edad fueron inoculadas con las fracciones a, b, c, d y e ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenidas por filtración en Biogel-P6 ($1 \times 132 \text{ cm}$) aplicando $5 \mu\text{l}$ por hipocotilo e incubando por 24 horas. Al término del período de incubación se cosecharon los hipocotilos, cuantificando la concentración de faseolina. Los controles recibieron agua destilada.

TABLA 3. AZUCARES IDENTIFICADOS EN LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE LEVADURA

MUESTRA	GLUCOSA	MANOSA	OTRO
FRACCION CRUDA	+	*	+
I	+	*	-
II	+	*	+
III	+	*	+
HI	+	*	-
HII	+	*	-
HIII	+	*	+
a	+	-	-
b	+	-	-
c	+	-	-
d	+	-	-
e	+	-	-

Cromatografía descendente en papel de la fracción cruda de levadura y las fracciones resultantes de la separación en Biogel-P6. Se denota como presencia (+), ausencia (-) y presencia probable (*). Los cromatogramas se revelaron por aspersión con solución de AgNO_3 66% y se obtuvieron los R_f para cada mancha resultante (ver cuadro A2 apéndice).

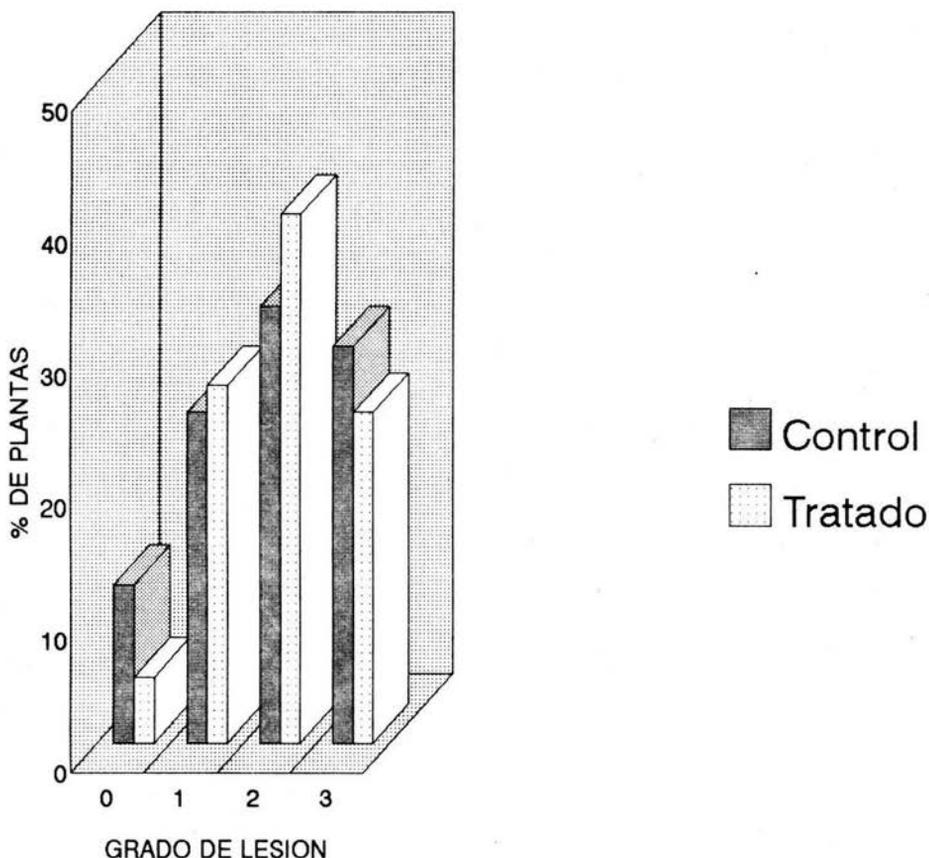


Figura 8. Desarrollo de la enfermedad en plantas de frijol a 0 horas de incubación. Plántulas de frijol de 7 días de edad fueron inoculadas con la fracción cruda de levadura ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) aplicando $5 \mu\text{l}$ por hipocotilo y a tiempo 0 de incubación desafiadas con *Colletotrichum lindemuthianum* aplicado como micelio en el mismo hipocotilo. El desarrollo de las lesiones se observó a los 10 días y se gráfico como grado 0, 1, 2 y 3 (ver texto) en porcentaje de plantas afectadas. Los controles recibieron agua destilada en lugar de extracto de levadura.

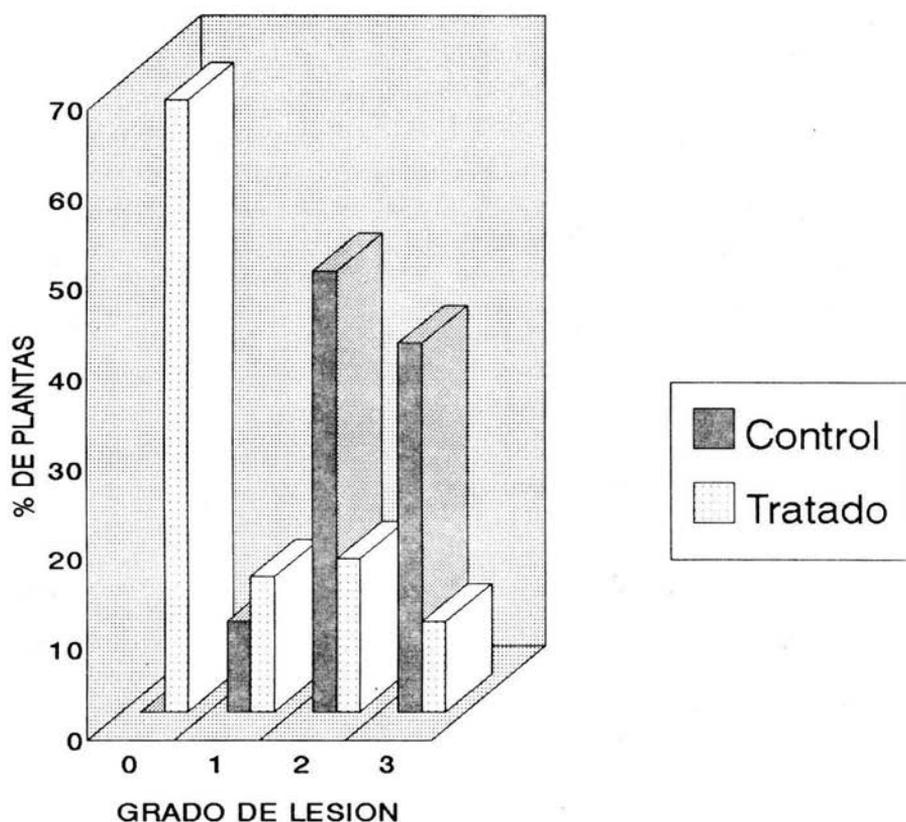


Figura 9. Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 24 horas de incubación. Plántulas de frijol de 7 días de edad fueron inoculadas la fracción cruda de levadura ($0.15\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aplicando $5\mu\text{l}$ por hipocotilo y a las 24 horas de incubación desafiadas con *Colletotrichum lindemuthianum* aplicado como micelio en el mismo hipocotilo. El desarrollo de las lesiones se observó a los 10 días y se gráfico como grado 0, 1, 2 y 3 (ver texto) en porcentaje de plantas afectadas. Los controles recibieron agua destilada en lugar de extracto de levadura.

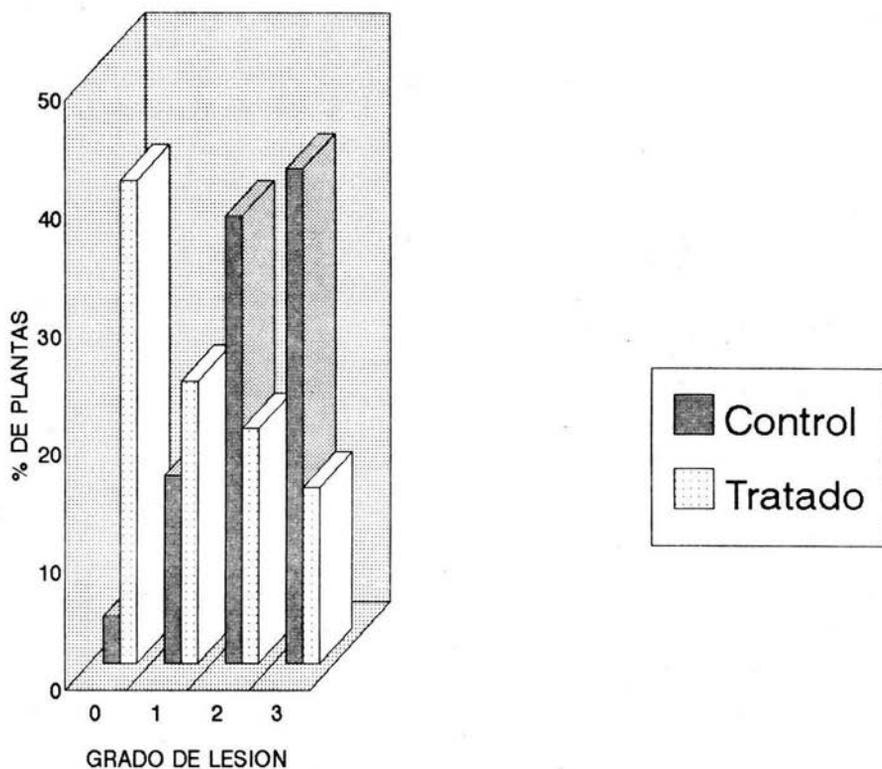


Figura 10. **Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 48 horas de incubación.** Plántulas de frijol de 7 días de edad fueron inoculadas con la fracción cruda de levadura ($0.15\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aplicando $5\mu\text{l}$ por hipocotilo y a las 48 horas de incubación desafiadas con *Colletotrichum lindemuthianum* aplicado como micelio en el mismo hipocotilo. El desarrollo de las lesiones se observó a los 10 días y se gráfico como grado 0, 1, 2 y 3 (ver texto) en porcentaje de plantas afectadas. Los controles recibieron agua destilada en lugar de extracto de levadura.

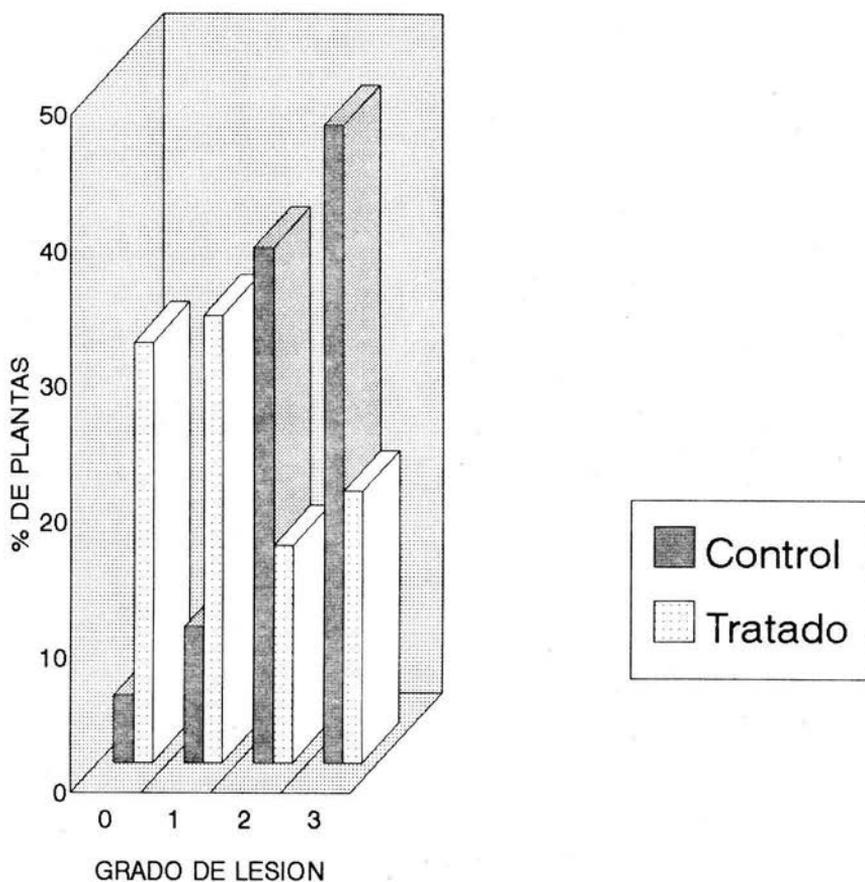


Figura 11. **Desarrollo de enfermedad en plantas de frijol a 72 horas de incubación.** Plántulas de frijol de 7 días de edad fueron inoculadas con la fracción cruda de levadura ($0.15\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aplicando $5\mu\text{l}$ por hipocotilo y a las 72 horas de incubación desafiadas con *Colletotrichum lindemuthianum* aplicado como micelio en el mismo hipocotilo. El desarrollo de las lesiones se observó a los 10 días y se gráfico como grado 0, 1, 2 y 3 (ver texto) en porcentaje de plantas afectadas. Los controles recibieron agua destilada en lugar de extracto de levadura.

5. DISCUSION

La capacidad de la pared celular de los hongos de estimular fitoalexinas y otras respuestas de defensa en plantas se ha reportado por investigadores como Albersheim y Anderson (1975) quienes en diversos trabajos reportan la actividad de hongos patógenos y no patógenos del frijol y otros sistemas biológicos como modelos de estudio de la patogénesis.

En este sentido, al desarrollar este trabajo se utilizó un hongo no patógeno como lo es la levadura de la cerveza *Saccharomyces cerevisiae* para determinar su actividad estimuladora de faseolina. En 1978, Hahn y Albersheim utilizaron un extracto de levadura el cual probaron en frijol soya (*Glycine max* L.) definiéndolo como un poderoso estimulador de la acumulación de la fitoalexina en sus tejidos. Este estimulador lo compararon con la actividad del obtenido del fitopatógeno *Phytophthora megasperma var sojae* y encontraron que aplicando la misma concentración en cotiledones la respuesta es muy similar; por otro lado, aplicando en hipocotilos encontraron que la estimulación por la levadura fue menor.

En la variedad mexicana del frijol (cultivar flor de mayo) se han probado en ensayos en hipocotilo, filtrados de cultivo del hongo no patógeno del frijol *P. boehmeriae* (Farías, 1986), del patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Zavala, 1989) así como componentes de sus paredes celulares (Zavala, 1993), reportándose en todos estos trabajos la acumulación de la faseolina. Se planteó probar el estimulador derivado de la levadura y evaluar su actividad ya que se conocía el patrón de respuesta en hipocotilos de esta especie y con la idea de usar un preparado aceptable por el público y de fácil manejo, en el tratamiento de las plantas.

Se utilizó la concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en equivalentes de glucosa que procede de una cinética de acumulación de faseolina con el extracto crudo de levadura. Posteriormente se realizó una cinética de acumulación de faseolina en hipocotilos de frijol usando períodos de incubación con el extracto de 0 a 72

horas. El máximo nivel de concentración de faseolina se observó a las 24 horas de incubación y fue disminuyendo hacia las 48 y 72 horas (figura 1).

En este sentido estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Farías (1986) y Granados (1986) quienes reportan sus valores máximos de faseolina a este período de tiempo en la misma variedad, sólo que inoculando con *P. bohemeriae*. Diversas variedades resistentes de frijol frente al hongo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* muestran una cinética similar para faseolina (Soriano y Medina, 1989) indicando que este patrón de respuesta es común en las plantas de frijol y obedece a las rutas bioquímicas inducidas en el tejido. Por un lado, la respuesta inducible se debe a la liberación de precursores de faseolina almacenados en vacuola como los glicósidos (Ibarra, 1986) y por otro lado se activa la transcripción de las primeras enzimas clave para el inicio de la ruta de biosíntesis de fitoalexinas isoflavonoides como lo son la FAL (fenilalanina amoniolasa) y CHS (chalcona sintasa).

Tomando en cuenta lo anterior, se puede decir que la acumulación de fitoalexinas es una primer respuesta al ataque fungal, después de la cual se activan otras vías de defensa las cuales pueden incluir la transcripción de genes involucrados en las síntesis de proteínas para el reforzamiento de pared celular, así como a las enzimas involucradas en tales rutas.

El preparado de levadura estimuló faseolina en el modelo biológico utilizado de una manera similar a lo referido para hongos patógenos, de manera que las observaciones presentadas en este trabajo se suman a las realizadas por Cline et al (1978) quienes probaron un preparado similar en otra variedad de frijol (Dark Red Kidney var. Charlvoix) y papa; esto refuerza la idea de que las plantas pueden reconocer y responder a componentes comunes de las paredes celulares fungales, y de esta manera desencadenar una respuesta inmediata local al ingreso del patógeno por acumulación de estos compuestos tóxicos como las fitoalexinas.

Al buscar en el extracto de levadura componentes de naturaleza oligomérica de tamaño similar a los reportados para paredes de *Colletotrichum lindemuthianum* por Zavala (1993), se encontró que la separación por

cromatografía de filtración en Biogel-P6 de la fracción cruda de levadura produjo 3 grupos principales, que se clasificaron como grupo I, II y III (figura 2). El grupo I corresponde a azúcares excluidos de la columna de Biogel por contener los fragmentos más grandes, los cuales estimularon poca acumulación de faseolina (79.3 $\mu\text{g/gpf}$). Por el contrario la actividad encontrada para el grupo II en donde se concentran fragmentos de tamaño medio (oligómeros) fue de 95.8 $\mu\text{g/gpf}$; el pico III mostró poca actividad, similar a la del pico I. En el grupo I se consideran cadenas de más de 6000 D y en el grupo III se agrupan los monómeros de azúcares (200-400 D), en diferentes trabajos se ha reportado que polisacáridos y cadenas muy pequeñas de azúcares no tienen la capacidad de estimular la acumulación de fitoalexinas; coincidiendo en este sentido con lo observado en este trabajo. Zavala (1993) reporta la mayor actividad estimuladora de faseolina en fragmentos de bajo peso molecular (oligómeros) de 2 picos que corresponden a las fracciones 24 a la 43 y en los resultados aquí presentados se pudo cuantificar la mayor concentración de faseolina inducida por fracciones que contienen las cadenas tipo oligómero. Por otro lado la estimulación observada con el grupo II no alcanzó el valor de la concentración de faseolina encontrado con el extracto sin fraccionar que fue de 158.4 (promedio de 3 repeticiones). Se encontró entonces que la actividad estimuladora reside básicamente en oligosacáridos de la fracción cruda de levadura, coincidiendo en este sentido con lo reportado por otros autores como Hahn (1978), Zavala (1993), Aldington y Fry, (1993).

El hidrolizado obtenido de someter a la fracción cruda con HCl 2M cuando se separó por cromatografía de filtración en Biogel-P6 también originó 3 grupos que se grafican en la figura 4 (HI, HII y HIII).

Al igual que con los grupos I, II y III estos se probaron en hipocotilos de plántulas de frijol que se incubaron por 24 horas, a la misma concentración en equivalentes de glucosa. La inducción de faseolina por cada grupo se ve en la figura 5 y en este caso el primer grupo que eluyó (HI) de la columna tuvo un actividad inductora similar al control (agua); el grupo HII fue efectivo en la estimulación junto con el grupo HIII con valores de concentración de faseolina

similares de 99.8 y 106.8 respectivamente. La estimulación de faseolina por el pico HIII que corresponde a fragmentos pequeños o monómeros no fué la esperada, ya que los reportes indican que los monosácaridos o cadenas muy pequeñas de azúcares no son potentes como estimuladores de fitoalexinas. La respuesta evaluada pudo deberse a alguna modificación por la acción de el ácido sobre los componentes del extracto de levadura o a que algún componente del grupo HII eluyera junto con las fracciones correspondientes al pico HIII, sin embargo, no existe algún dato que permita asegurarlo. Por otro lado, la estimulación de la faseolina en los hipocotilos por los picos HII y HIII no alcanzó el valor observado en la incubación a 24 horas con la fracción cruda.

Respecto a la hidrólisis enzimática, una vez obtenidas la fracción soluble e insoluble por centrifugación fueron probadas en hipocotilos de plántulas de frijol e incubadas por 24 horas para evaluar su capacidad de inducir faseolina (tabla 2). La cantidad de faseolina inducida por la pastilla en la que probablemente se encuentre a la quitina como componente principal, fue inferior que la observada con el sobrenadante (55.9 y 80.3 $\mu\text{g/gpf}$ respectivamente). El sobrenadante se eligió para una separación más fina en cromatografía de filtración en Biogel-P6 (figura 7), resultando en 5 grupos principales denominados **a**, **b**, **c**, **d**, y **e**. La acción de la enzima definió los grupos de azúcares que corresponden a fragmentos de tamaño medio o oligómeros (**b**, **c**, **d**) y que efectivamente estimularon el compuesto antibiótico de defensa vegetal al aplicar cada uno de estos grupos en hipocotilos de frijol (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ equ. de glucosa), e incubados por 24 horas; las concentraciones de faseolina estimuladas fueron de 81.1, 96.5 y 98.5 $\mu\text{g/gpf}$ para los picos **b**, **c** y **d**. El pico **a** que corresponde a fragmentos mayores de 6000D estimuló 64.1 $\mu\text{g/gpf}$ y el pico **e** 59.4 μg de faseolina el cual agrupa fragmentos pequeños o monómeros.

En general, en los tratamientos de separación por cromatografía de filtración en Biogel-P6 de la fracción cruda e hidrolizada con ácido y enzima, se resume que los grupos que principalmente indujeron la acumulación de faseolina en los hipocotilos, corresponden a fracciones que incluyen a fragmentos de tamaño medio u oligómeros (fracción 23 y 50). En el extracto de levadura

caracterizado por Hahn en 1978 las fracciones con mayor actividad estimuladora de fitoalexinas correspondieron a las comprendidas entre la fracción 25 a 40, esto es, a oligosacáridos coincidiendo en este sentido con el presente estudio, ya que la mayor acumulación de faseolina inducida correspondió a cadenas tipo oligosacárido.

Para definir si la capacidad inductora del extracto residía en cadenas constituídas principalmente de glucosa se procedió a identificar los azúcares involucrados en la estimulación se analizaron en cromatografía descendente en papel los grupos I, II, III, HI, HII, HIII, a, b, c, d y e así como la fracción cruda de levadura. Según se observa en la tabla 3, la glucosa estuvo presente en todas las muestras analizadas, por lo que creemos que la actividad estimuladora de faseolina del extracto utilizado sobre hipocotilos de frijol radica principalmente en cadenas tipo glucano. En este sentido, nos apoyamos en los resultados obtenidos por Hahn en 1978 que separó las cadenas conformadas principalmente de glucosa del resto del extracto y encontró la mayor actividad estimuladora en éstas respecto a las constituídas de manosa.

Si bien es probable la presencia de manosa en el extracto este azúcar no pudo discriminarse de la glucosa por que el método de análisis utilizado es poco sensible para separar compuestos con un peso molecular tan similar. Al revelar los cromatogramas se encontró en los grupos I, II, III, HI, HII y HIII así como en la fracción cruda una mancha grande donde se identificó a la glucosa y debido al tamaño de esta mancha, muy probablemente la manosa esté presente; Hahn (1978) refiere en su extracto de levadura la presencia no sólo de glucosa si no también de manosa y otros azúcares en cantidades mínimas los cuáles no tienen papel en la estimulación de fitoalexinas. Por otro lado en los grupos obtenidos de la separación del hidrolizado enzimático (a, b, c, d, y e) se detectó la presencia exclusivamente de glucosa puesto que son el resultado de la acción de una glucanasa, por lo que la estimulación de faseolina por estos picos en los hipocotilos (figura 7) se debió a la presencia de oligómeros constituídos principalmente de glucosa.

Un tercer azúcar fue detectado en la fracción cruda y en los picos II, III y HIII cuyo Rf es de aproximadamente 0.5, probablemente se trate de un monosacárido ya que se detectó en el extracto sin fraccionar y al ser este separado por filtración en Biogel-P6 se encontró en gran cantidad en el grupo III y HIII que corresponde a fragmentos pequeños o monómeros, en el grupo II se detectó una mancha pequeña de este azúcar, el cual no tiene gran actividad estimuladora, ya que en el pico III no afectó la concentración de faseolina acumulada en los hipocotilos incubados por 24 horas puesto que este valor fue cercano al encontrado para el pico I el cual no tenía este azúcar. La presencia del azúcar desconocido en el pico HIII no tuvo un papel en la estimulación de faseolina ya que el pico HII estimuló casi igual (106.8 y 99.8 $\mu\text{g/gpf}$ respectivamente) y en este último no fue detectado. Probablemente los valores tan cercanos en la concentración de faseolina estimulada por ambos picos fue debida al tratamiento ácido, sin embargo, para apoyar lo anterior no contamos con evidencia suficiente.

Resumiendo, la estimulación de faseolina por la aplicación de la levadura (fracción cruda) y de los grupos resultado de la separación en Biogel-P6, es seguramente debida a la presencia de fragmentos de tamaño medio (oligómeros) con residuos de glucosa. Esto se apoya en observaciones hechas por Hahn (1978) que caracteriza la actividad del extracto de levadura y concluye que esta es debida a la presencia de oligoglucanos, ya que este autor separó de la fracción cruda las cadenas tipo mananos que presentaron poca actividad estimuladora.

Zavala en 1993 caracterizó una fracción del fitopatógeno del frijol *Colletotrichum lindemuthianum* y encontró un oligómero formado de 9 residuos de glucosa, principalmente con enlaces β -1,3. Puesto que la liticasa rompe enlaces β -1,3, en nuestro sobrenadante encontramos 5 grupos principales, por otro lado, Hahn reporta la existencia en el extracto de levadura de otro tipo de enlaces β (1-4, 1-6 y 3-6) los cuales no se estudiaron en este trabajo.

Una vez comprobada la actividad estimuladora de la fracción cruda de levadura en la cinética de acumulación de faseolina (figura 1) al término de cada período de incubación con el extracto, se realizaron pruebas de desafío con el

fitopatógeno del frijol *Colletotrichum lindemuthianum*. Los lotes mantenidos por aproximadamente 10 días, cubiertos con bolsas plásticas, fueron evaluados por inspección visual en base a la tabla A1 (ver apéndice).

Los valores máximos de faseolina encontrados después de 24 horas de incubación con la fracción cruda de levadura, coinciden con los mayores porcentajes de plantas protegidas (plantas con grado de lesión 0). Conforme los valores de la concentración de faseolina disminuyeron hacia las 48 y 72 horas de igual manera disminuyeron los porcentajes de plantas que se protegieron; esto es, existió una relación directa entre la concentración de faseolina estimulada en los hipocotilos y la inducción de resistencia a nivel local (figuras 8, 9, 10 y 11).

Similares resultados reportó Farías en 1986 usando hongo como protección (*P. bohemerae*) donde obtuvo una relación entre la máxima acumulación de faseolina (a 24 horas) con la mayor protección de plántulas de frijol.

La inducción de resistencia a cultivos agrícolas se ha vislumbrado como una alternativa importante de control de enfermedades; a nivel experimental son varios los reportes que se tienen con resultados muy espectaculares que en el caso de la levadura aún no dan los resultados esperados en campo (Lyon et al., 1995), este autor señala en una reciente revisión, que se indujo resistencia en cebada al mildiú reduciendo en un 90% la infección a nivel invernadero, pero que en campo el tratamiento fue menos efectivo aunque no menciona porcentajes.

Chávez en 1993 ensayo un método de inducción de resistencia en frijol cultivar flor de mayo, con un estimulador de *Phytophthora bohemerae* en condiciones de invernadero y observó que repetidas inoculaciones con el mismo protegen al cultivo de la antracnosis.

Lyon et al (1995), también refiere la inducción de la enzima FAL, primera de la síntesis fenilpropanoide de la que derivan fitoalexinas isoflavonoides, por la inducción con estimuladores derivados de la levadura. En nuestro caso únicamente se evaluó un metabolito secundario, la faseolina, como una respuesta local inducida. Sin embargo, es probable que se produzcan otras respuestas de defensa por la inoculación con el extracto, por lo que resulta atractivo el estudio

de otras respuestas como producción de lignina, producción de enzimas PR (relacionadas a la patogenésis) como las quitinasas y β -1,3 glucanasas entre otras para conocer con mayor detalle las respuestas de defensa, tanto a nivel local como sistémico.

El extracto de levadura utilizado en el presente trabajo aplicado a hipocotilo de plántulas de frijol observo una actividad de inducción de faseolina mayor a la que resulto cuando este se fragmento por cromatografía de filtración, esto es, que aunque se sabe que la mayor actividad estimuladora de fitoalexinas obedece al reconocimiento por partes de la planta a oligosacáridos, el sistema utilizado respondió mejor al extracto sin fraccionar.

Asimismo, sienta las bases para considerar el tratamiento con estos extractos, en ensayos de resistencia inducida a las enfermedades, con miras a optimizar la aplicación práctica del tratamiento.

CONCLUSIONES

La fracción cruda de levadura estimula la acumulación de faseolina en hipocotilos de plántulas de frijol, con una máxima concentración a las 24 horas de incubación.

De los 11 picos principales obtenidos de la separación de los componentes de la fracción cruda de levadura y de sus hidrolizados ácido y enzimático por cromatografía de filtración, se encontró que los más activos como inductores de faseolina corresponden a fragmentos en el volumen incluido (oligómeros).

Se identificó a la glucosa como el componente principal de las fracciones del extracto de levadura.

Se encontró una relación entre la concentración de faseolina estimulada por la levadura y los mayores porcentajes de protección a nivel local en plántulas de frijol de 7 días de edad.

RECOMENDACIONES

El uso de la levadura como un pretratamiento a cultivos de importancia agrícola puede ser una alternativa viable, toda vez que su manejo es fácil, por lo que la evaluación de posibles respuestas sistémicas inducidas (enzimas e inhibidores de proteasas) serían de gran valor en una mayor caracterización del mismo; esto, aunado a la evaluación de otras respuestas a nivel local (lignificación o enzimas hidrolíticas).

La diversificación de la aplicación del extracto a otros sistemas biológicos podría ser favorable para la evaluación de respuestas de defensa y posterior comparación sobre las mismas.

Evaluar la aplicación del extracto de levadura a cultivos de frijol por aspersión utilizando algún agente tensoactivo (detergente) que puede permitir la absorción del extracto por las hojas, sería importante para estandarizar alguna metodología de uso, tanto en invernadero como en campo.

PROPUESTAS DE INVESTIGACION

Una constante preocupación acerca del manejo de los cultivos agrícolas es sin duda el uso constante de fungicidas e insecticidas para el control de plagas y enfermedades - fungales. En este sentido, existe un gran interés por desarrollar estrategias que lleven por un lado, a una disminución en el uso de tales sustancias usando métodos alternativos de control y por el otro lado, generar plantas que constitutivamente muestren resistencia - al ataque de parásitos y plagas.

Considero que la exploración de estas dos líneas llevaría a un conocimiento muy - valioso sobre como las plantas pueden censar su entorno y responder a los cambios a los que constantemente estan sujetas,

El estudio detallado de la estructura química de los estimuladores fungicidas así como del endógeno clarificarían su papel exacto en la respuesta de la planta, considerando que son una primer señal que desencadena toda una serie de mecanismos de defensa. En base a la estructura que se genere del análisis de estudiar por métodos finos (por ejemplo resonancia magnética nuclear) los componentes de la pared celular involucrados en la señal, se derivaría un modelo del cuál se podrían sintetizar químicamente compuestos semejantes. La evaluación de la respuesta de la planta a tales compuestos sería un punto - muy importante de verificar en laboratorio, invernadero y campo experimental;; considerando además varios sistemas biológicos para tal evaluación.

Por otro lado, el mecanismo que la planta desencadena en respuesta al ataque del agresor, podría ser evaluada utilizando técnicas de Biología Molecular. De esta manera - se conocerían los genes que se expresan en respuesta al ataque e inclusive discernir las probables rutas que se derivan tanto del ataque por microorganismos como del infligido - por insectos y conocer los puntos críticos de regulación, así como para evaluar si existen diferentes respuestas a diferentes agresores.

Desde este punto de vista se puede considerar no solo el uso de la planta de interés sino plantas modelo cuyos genomas son más fáciles de manipular debido a su corto ciclo de vida, y al conocimiento que de ellos se tiene, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* que ofrece una buena alternativa de uso.

Un punto importante sería el de generar plantas transgénicas en las cuáles se halla insertado un gen (o genes) que sean importantes en la regulación o modulación de la respuesta a los patógenos, sin embargo, para llegar a este último objetivo se debe generar - el conocimiento suficiente acerca de los mecanismos involucrados en tales respuestas.

APENDICE

SOLUCION NUTRITIVA

SULFATO DE AMONIO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.18 g/l

FOSFATO MONOPOTASICO KH_2PO_4 3.5 g/l

SULFATO DE MAGNESIO MgSO_4 10.24 g/l

NITRATO DE POTASIO KNO_3 2.5 g/l

SULFATO DE CALCIO CaSO_4 2.4 g/l

Tomado de Soriano y Medina, 1989.

MEDIO DE CULTIVO EJOTE-PAPA-DEXTROSA-AGAR

PARA 1000 ml:

- 190 gr de ejote molido.**
- 18 gr. de agar.**
- 10 gr. de papa.**
- 5 gr. de dextrosa.**
- 1000 ml de agua destilada estéril.**

Se pesan 190 gr de ejote en trozos, 18 gr de agar, 10 gr de papa y 5 gr de dextrosa, se afora a 1000 ml de agua destilada y se esteriliza por 15-20 min. a 121°C 1.5 kg/cm² de presión.

MEDIO PAPA-DEXTROSA

PARA 1000 ml:

- 200 gr de papa.**
- 20 gr de dextrosa.**
- 1000 ml de agua destilada estéril.**

200 gr de papa cortada en trozos se cocen en 500 ml de agua destilada por 15 minutos a 121°C 1.5 kg/cm². El caldo obtenido se filtra y se agregan 20 gr de dextrosa, se afora a 1000 ml con agua destilada. Se esteriliza el caldo final en matraces Erlenmeyer.

GRADO DE ENFERMEDAD	DESCRIPCION
0	Lesión localizada y superficial en el sitio de inoculación y/o manchas café superficiales de hipersensibilidad. Plantas en buen estado en general.
1	Manchas café extendidas. Hojas primarias con un 50% de su superficie clorótica con pequeños puntos necróticos. Epicotilo con leve amarillamiento.
2	Las lesiones necróticas se extienden al epicotilo. Hojas primarias con un 75% de su superficie clorótica con manchas necróticas y nervaduras y bordes cafesosos. Hojas trifoliadas amarillas.
3	Las lesiones se profundizan, con un centro hundido necrótico. Hojas primarias y trifoliadas amarillentas con manchas necróticas o secas (100% dañadas). Tejidos invadidos por hongo. Plantas muertas.

CUADRO 1A. DESCRIPCION DE LOS PARAMETROS DE LA RESPUESTA DE ENFERMEDAD EN HIPOCOTILOS DE FRIJOL. (Chávez, 1992).

VALORES DE Rf

MUESTRA	MANCHA 1	MANCHA 2	MANCHA 3
GLUCOSA 10 %	--	0.342	--
MANOSA 10 %	0.31	--	--
FRACCION CRUDA	0.312	0.346	0.492 +
I	0.32	0.352	--
II	0.316	0.358	0.476 -
III	0.304	0.350	0.486 +
HI	0.318	0.342	--
HII	0.324	0.354	--
HIII	0.314	0.331	0.478 +
a	--	0.358	--
b	--	0.346	--
c	--	0.338	--
d	--	0.354	--
e	--	0.356	--

CUADRO A2.

Valor de Rf determinado de la cromatografía en papel para soluciones patrón de glucosa y manosa al 10 % así como para las fracciones de levadura de los diferentes tratamientos. (+) mancha muy grande, (-) mancha pequeña.

LITERATURA CONSULTADA

Agrios, N. G. 1989. Fitopatología. Ed. Limusa. México. pp. 19-38, 139-169.

Albersheim, P. y Anderson, J. A. 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. Ann. Rev. Plant. Physiol. 26: 31-52.

Aldington, S. y Fry, S. C. 1993. Oligosaccharins. pp. 2-38, 59-62. En:in Advances in Botanical Research. Callow, J. A. ed. Vol. 19. Academic Press. Great Britain. 334 p.

Anderson, J.A. and Albersheim, P. 1975. Host-Pathogen interactions. VIII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. Plant Physiol. 56, 286-291.

Anderson, A.J. 1978. Isolation from three species of *Colletotrichum* of a glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin in bean. Phytopathology 68:189-194.

Atlas, M.R. 1989. Microbiology. Fundamentals and applications. Maxwell Macmillan International editions. 2a. ed. USA. pp 313-430.

Bailey, J.A. 1973. IV. 1. Phaseollin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following infection by fungi, bacteria and a virus. pp 337-353. EN: Third long Ashton Symposium 1971. Fungal pathogenicity and the plants response. Edited by Byrde, W. J.R., and Cutting, V.C. Academic Press. England.

Bailey, J. A. 1982. Physiological and biochemical events associated with the expression of resistance to disease. pp 39- 57. EN: Active defense mechanisms in plants. Wood, R. K. S. Ed. Plenum Press. U. S. A.

Barz, W., 1990. Phytoalexins as part of induced defense reactions in plants: Their elicitation, function and metabolism. pp 140-151. EN: Chadwick, D.J. and Marsh, I. Bioactive Compounds from plants. Ciba Foundation Symposium 154. John Wiley and Sons. Great Britain.

Beckman, C. H. 1987. The nature of wilt disease of plants. A. P. S. Press. U. S. A. pp. 53-67.

Benhamou, N.; Charberland, H. y Pauzé, F. 1990. Implication of pectic components in cell surface interaction between tomato root cells and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersi*. Plant. Physiol. 92, 995-1003.

Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT editor. México. pp 658.

Bostock, R. M. y Stermer, B. A. 1989. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 243-71.

Campos, A.J. 1987. Enfermedades del frijol. Ed Limusa. México. pp 5-19.

Cline, K., Wade, M. and Albersheim, P. 1978. Host-Pathogen interactions XV. Fungal glucans which elicit phytoalexins accumulation in soybean also elicit the accumulation of phytoalexins in other plants. Plant Physiol. 62, 918-921.

Chaplin, F.M. 1986. Monosaccharides. EN: Carbohydrate analysis. A practical approach. Edited by Chaplin, M. F. and Kennedy, J.F. Practical approach-series. IRL PRESS. England. 228 p.

Chávez, P.Z. 1992. Ensayo de un método de control para estimular la resistencia natural de la planta de frijol. Tesis Lic. Biol. U.M.S.N.H. México. 163 p.

Cohen, Y.; Gisi, U. y Niderman, T. 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl-ester. *Phytopathology*. Vol. 83, No. 10, 1054-1062.

Cooper, M. R. 1983. the mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. pp. 102-102. En: *Biochemical Plant Pathology*. Callow, J. A. Ed. John Wiley and Sons Ltd. England.

Dann, E. K. y Deverall, B. J. 1995. Effectiveness of of systemic resistance in bean against foliar and soilborne pathogens as induced by biological and chemical means. *Plant pathology* 44, 458-466.

Darvill, G.A. y Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35:243-75.

Díaz, F.A. 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Ed. Trillas. México. pp 9-15,55-69.

Dixon, R. A.; Dey, P. M.; Lawton, M. A. y Lamb, C. J. 1983. Phytoalexin induction in french bean. Intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hipocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. *Plant. Physiol.* 71: 251-56.

Dixon, R. A. 1986. The phytoalexin response: Elicitation, signalling and control of host gene expression. *Bol. Rev.* 61, 239-291.

Dixon, R.A., Harrison, M.J. and Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.

Dori, S.; Solel, Z. y Barash, I. 1995. Cell wall-degrading enzymes produced by *Gauemannomyces graminis* var *tritici* in vitro and in vivo. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol No.

Ebel, J. 1986. Phytoalexins synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:235-64.

Enyedy, J.A., Yalpani, N., Silverman, P. y Raskin, I. 1992. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*. Vol. 70, 879-886.

Farías, R.R. 1986. La capacidad inductora de resistencia del medio extracelular de *Phytophthora boehmeriae*. Tesis Lic. Biol. U.M.S.N.H. México

Gao, S. y Shain, L. 1995. Activity of polygalacturonase produced by *Chryphonectria parasitica* in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 46. No. 3. March. 199-213.

García, P.E. 1992. Respuesta bioquímica de protoplastos de frijol *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de mayo a estimuladores bióticos. Tesis Lic. Biol. U.M.S.N.H. México. pp 10-11.

Granados, G. M. E. 1986. Caracterización de la respuesta fisiológica de la planta de frijol *Phaseolus vulgaris* a la presencia de un hongo no

patógeno *Phytophthora boehmeriae*. Tesis Lic. Biol. U.M.S.N.H. México. pp 5-6.

Hahn, M. G. y Albersheim, P. 1978. Host-Pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant. Physiol.* 62,107-111.

Harborne, J. B. 1990. Role secondary metabolites in chemical defense mechanisms in plants. pp 126-139. EN: Bioactive compounds from plants. *Ciba Foundation Symposium 154*. Ed. Chadwick, D. J. and Marsch, J. John Wiley and Sons. Great Britain. 242 p.

Hoffland, E.; Pieterse, C. M. J.; Bik, L. y Pelt, J. A. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant pathology*. Vol. 46. No. 4. 309-320.

Ibarra, B. G. A. 1993. Almacenamiento de la fitoalexina faseolidina en vacuolas de frijol *Phaseolus vulgaris*. Tesis Lic. Biol. U: M. S. N. H. México. pp. 30-32.

Ingham, J. L. 1981. Phytoalexin induction and its taxonomic significance in the Leguminosae (Subfamily Papilionidae). pp. 599-626. En: *Advances in legume systematics*. Polhill, R. M. y P. H. Raven eds. The University Reading. England.

Ingham, J. L. 1982. Phytoalexins from the leguminosae. pp. 21-55. En: *Phytoalexins*. Bailey, J. A. y J. W. Mansfield eds. Blackie and Sons Ltd. Glasgow. England.

Jakobek, L. J. y Lindgren, B. P. 1993. Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *The Plant Cell*. Vol. 5, 49-56.

Jauch, C. 1979. *Patología Vegetal*. Ed. El Ateneo. Argentina. pp 218-269.

Joosten, J. M. H. A.; Varbakel, H. M.; Nettekoven, M. E.; Van Leewen, J.; Van der Vassen, R. T. M. y Wit, P. J. G. M. 1995. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 46. No. 1. 45-59.

Kay, E.D. 1979. Food legumes: Crop and product Digest No. 3. Tropical Product Institute. England. pp 125-135.

Kúc, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience*. 32(1): 854-860.

Kúc, J. 1990. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. pp 213-230. EN: *Bioactive Compounds from plants*. Ciba Foundation Symposium 154. Ed. Chadwick, D.J. and Marsch, J. John Wiley and Sons. Great Britain. 242 p.

Leman, M.; Van Pelt, J. A.; Den Ouden, F. M.; Heinsbroek, M.; Bakker, P. A. y Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance against *Fusarium* with of radish by lipopolisaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 85: 1021-1027.

Lepiz, R.J. 1986. Enfermedades del frijol. *Rev. Mex. de Fitopatología*. Vol. 4 No. 2. 176-181.

Manners, J.G. 1993. Principles of plant pathology. 2nd. ed. Cambridge University Press. 343 p.

Lyon, G. D.; Reglinski, T. y Newton, A.C. (1995) Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathology*, 44, 407-427.

Mansfield, J. W. 1982. The role of phytoalexins in disease resistance. pp 253-288. EN: Phytoalexins. Editado por Bailey, J. y Mansfield, W. 1982. ED. Blackie. Great Britain.

Mansfield, J. W. 1983. Antimicrobial compounds. pp 237-264. EN: Biochemical Plant Pathology. Edited by Callow, J. A. John Wiley and Sons Ltd. England.

Mayama, S.; Bordin, A. P. A.; Morikawa, T. y Tani, T. 1991. Role of phytoalexins in host defense reactions. pp. 203-212. En: Molecular strategies of pathogens and host plants. Patil, S. S. ed. Springer-Verlag. U. S. A.

National Academy of Science. 1979. Tropical legumes: Resource for the future. U. S. A. pp. 1-11.

National Academy of Science. 1981. Control de plagas de plantas y animales. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Vol. I. Ed. Limusa. pp 1-15, 41-45, 55, 101-125, 157-163.

Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:369-389.

Nuñez, H. 1985. Estudios sobre la acumulación de fitoalexinas en semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. "flor de mayo". Tesis Lic. Biol. U. M. S. N. H. México. 58p.

Ouchi, S. 1991. Molecular biology of fungal host-parasite interactions. pp.15-27. En: Molecular strategies of pathogens and host plants. Patil, S. S. Springer-Verlag. U. S. A.

Pastor, C. M. A., Otoyá, M.M., Molina, A. 1995. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from middle America and andean South America in different common bean races.

Plummer, D.T. 1981. Introducción a la bioquímica práctica. Ed. McGraw-Hill latinoamericana. Colombia. pp 76-177.

Rojas, G.M. 1993. Fisiología Vegetal aplicada. 4a. ed. Interamericana McGraw-Hill México. pp 256, 259-261.

Roulin, S. y Buchala, A. J. 1995. The induction of β -1,3-glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol. 46. No. 3. 471-489.

Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E. 1994. Update on Plant-microbe interactions. Systemic Acquired Resistance. Plant. Physiol. 104:1109-1112.

Ryan, C.A., Farmer, E.E. 1991. Oligosaccharide signals in plants a current assessment. Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Bio. 41:651-674.

Sánchez, S.O. 1980. La flora del Valle de México. 6a. ed. Ed. Herrero. México. pp 214-215.

Schaffrath, U.; Scheineflug, H. y Reisner, H. J. 1995. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induce resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 46. No. 4. 293-307.

Sequeira, L. 1983. Mechanisms of induced resistance in plants. *Rev. Microbiol.* 37:51-79.

Sivan, A. y Chef, I. 1992. Microbial control of plant diseases. pp 335-354. EN: *Environmental microbiology*. Ed. Mitchel. Wiley-Liss Inc. USA. 411 p.

Smith, D.A. 1982. Toxicity of Phytoalexins. In phytoalexins. Ed. Bailey, J.A. and Mansfield, J. W. Blackie and Sons Ltd. pp 218-247.

Smith, A.J. et al., 1991. Rapid induction of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38,223-235.

Soriano, B. E. y Medina, M, 1989. Formación de fitoalexinas en variedades mexicanas de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 7: 74-80.

Stolp, H. 1988. *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. Cambridge studies in ecology. Cambridge University Press. Great Britain. pp 106-198.

Sutton, D. C. 1982. Field protection of bean against *Colletotrichum lindemuthianum* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Austral. Plant. Pathol.* 11(4): 50-51.

Theodorou, M.K., Scanlon, J.C.M. y Smith, I.H. 1982. Infection and phytoalexin accumulation in french bean leaves infected with spores of *Colletotrichum lindemuthianum* J. Phitopathol. 3,189-197.

Tu, J. C. 1992. Bean anthracnose. pp. 1-12. En: Plant disease of international importance diseases of vegetables and soil seed crops. Research Branch. Canada.

Van Etten, H. D.; Matthews, D. E. y Smith, D. A. 1982, Metabolism of phytoalexins. pp. 181-212. En: Phytoalexins. Bailey, J. A. y J. W. Mansfield eds. Blackie Glasgow and London. Great Britain.

Van Etten, H. D.; Matthews, D. E. y Matthews, D. S. 1989. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 143-64.

Ward, R.E. et al., 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell. Vol. 3,1085-1094.

Ye, X. S.; Pan, S. Q. y Kúć, J. 1989. Pathogenesis-related proteins and systemic resistance to blue mold and tobacco mosaic virus induced by tobacco mosaic virus, *Peronospora tabacina* and aspirin. Physiological and Molecular Plant Pathology. 35, 161-175.

Yoshikawa, M. 1983. Macromolecules, recognition, and the triggering of resistance. pp 267- 291. EN: Biochemical Plant Pathology. Ed. by Callow J.A. John Wiley and Sons Ltd. Great Britain.

Yoshikawa, M.; Kakeuchi, T. y Horino, O. 1990. A mechanism for ethylene-induced disease resistance in soybean: enhanced synthesis of an

elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37, 367-376.

Yoshikawa, M. y Takeuchi, Y. 1991. Molecular aspects of elicitation of host defense reactions. pp. 165-175. En: *Molecular strategies of pathogens of host plants*. Patil, S. S. ed. Springer-Verlag. U. S. A.

Zavala, P. M. G., Cano, H. y Soriano, E. 1989. Phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* as response to elicitor treatments to diferent bean tissues. *Biologia Plantarum* 31:221-226.

Zavala, P. M. G. 1993. Purificación y caracterización parcial de un fragmento de la pared celular de *Colletotrichum lindemuthianum* que estimula respuestas de defensa en frijol. Tesis M. en C. Inst. Invest. en Biol. Exp. Fac. de Ciencias Químicas. U. de Guanajuato. México. pp. 27-36.