

Comparación de la resistencia horizontal y vertical contra el tizón tardío de la papa en Toluca*

Comparison of vertical and horizontal resistance against late blight of potato in Toluca

Oswaldo Angel Rubio Covarrubias^{1§}, Mateo Armando Cadena Hinojosa y Román Flores López

¹Programa nacional de papa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Conjunto SEDAGRO, Metepec Estado de México. C. P. 52140. (machgg2@yahoo.com.mx; flores.roman@inifap.gob.mx). [§]Autor para correspondencia: oswaldorubio@inifap.gob.mx.

Resumen

Uno de los principales problemas del cultivo de la papa en México y a nivel mundial es el tizón tardío (*Phytophthora infestans*). Durante 3 años se hicieron evaluaciones bajo las condiciones de campo del Valle de Toluca, el centro de origen de *P. infestans*, para comparar 10 genotipos de la población A con resistencia vertical (combinación de genes mayores R y genes menores) y 10 genotipos de la población B con resistencia horizontal (sin genes R). La población A fue generada por el INIFAP en México y la población B en Perú por el Centro Internacional de la Papa. Los resultados demostraron que la población A fue significativamente superior en las 5 variables que se utilizaron para evaluar la resistencia [área relativa bajo la curva de infección, pendiente (pendiente de la regresión lineal: tiempo vs. % de infección foliar), % de las lesiones foliares cubiertas por esporangios, número de días después de la emergencia de las plantas cuando se observó la 1^{er} infección foliar y el rendimiento de tubérculos]. Estos resultados indican que los genes menores de resistencia de la población B operan con menor eficiencia que cuando están combinados con genes R, como ocurre en la población A.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, genes mayores y menores.

Abstract

One of the main problems of potato cultivation in Mexico and worldwide is late blight (*Phytophthora infestans*). During three years evaluations under field conditions Toluca Valley, the center of origin of *P. infestans* were to compare 10 genotypes of the population A vertical resistance (combination of higher R genes and minor genes) and 10 genotypes population B with horizontal resistance (no R genes). A population was generated by INIFAP in Mexico and Peru B population by the International Potato Center. The results showed that the population A was significantly higher in the 5 variables that were used to evaluate the resistance [relative area under the curve of infection, slope (slope of the linear regression: time vs. % leaf infection), % of foliar lesions covered by sporangia, number of days after emergence of the plants when the 1st foliar infection and tuber yield was observed]. These results indicate that minor resistance genes of the population B operate less efficiently than when combined with R genes, as in the population A.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, major and minor genes.

* Recibido: febrero de 2016
Aceptado: mayo de 2016

Introducción

El tizón tardío de la papa, causado por el oomiceto *Phytophthora infestans* Sulc., es uno de los principales problemas para la producción de papa en el mundo (Haverkort *et al.*, 2009). En México, el centro y noreste son las regiones más afectadas por la enfermedad, en donde se hacen al menos dos aplicaciones de fungicidas por semana durante la época de mayor incidencia de la enfermedad (Rubio *et al.*, 2000).

Desde la devastación de los campos de papa por el tizón tardío ocurrida en Irlanda en 1845, se intensificaron los esfuerzos por generar variedades resistentes. Inicialmente, los programas de mejoramiento genético de varios países utilizaron los genes mayores (genes R) provenientes de la especie silvestre Mexicana *Solanum demissum* como fuente de resistencia, sin embargo, muchas variedades cuya resistencia vertical se basaba en genes R se volvieron susceptibles en poco tiempo, por lo que se pensó que se deberían generar variedades con resistencia horizontal fundamentada en genes menores, con lo cual se esperaba obtener una resistencia duradera (Turkensteen, 1993; Landeo *et al.*, 1995).

La resistencia vertical también es conocida como resistencia cualitativa, resistencia específica o resistencia total y la resistencia horizontal como resistencia cuantitativa, resistencia general, resistencia parcial o resistencia de campo. Sin embargo, en la actualidad se sabe que los genes R están involucrados en todos los tipos de resistencia por lo que se está tratando de generar variedades con una combinación de varios genes mayores y menores, a lo cual se le ha llamado construir pirámides de genes (Adillah *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013). Esta estrategia se desarrolla actualmente con la ayuda de la ingeniería genética, pero algunas variedades viejas que poseen una combinación de genes mayores y menores, las cuales fueron generadas por métodos tradicionales en México y otros países, han demostrado que tienen una resistencia duradera (Grünwald *et al.*, 2002; Rietman *et al.*, 2012).

Desde que Van der Plank (1963) describió los conceptos de resistencia horizontal y vertical, ha habido un interés constante en diferenciar la resistencia horizontal y vertical. La pendiente de la curva de infección, la etapa de desarrollo de las plantas en la que aparecen las primeras lesiones, la presencia de esporangios en las lesiones, y la reacción de hipersensibilidad en las hojas son algunos de los parámetros que se han utilizado para diferenciar los dos tipos de resistencia. De estos parámetros, los dos primeros han sido

Introduction

Late blight, caused by oomycete *Phytophthora infestans* Sulc., is one of the main problems for potato production in the world (Haverkort *et al.*, 2009). In Mexico, central and northeast are the regions most affected by the disease, where at least two applications of fungicides are made per week during the period of greatest incidence of the disease (Rubio *et al.*, 2000).

Since the devastation of potato fields by late blight occurred in Ireland in 1845, efforts to generate resistant strains intensified. Initially, breeding programs of several countries used the largest (R genes) from the wild species Mexican *Solanum demissum* as a source of resistance, however, many varieties whose vertical resistance was based on R genes became susceptible soon genes, so it was thought that should generate varieties with horizontal resistance genes based on smaller, which is expected to get a lasting resistance (Turkensteen, 1993; Landeo *et al.*, 1995).

The vertical resistance is also known as qualitative resistance, specific resistance or resistance and horizontal overall resistance as quantitative resistance, overall strength, resistance or partial field resistance. However, at present it is known that the R genes are involved in all types of resistance so it is trying to develop varieties with a combination of several major and minor genes, to which has been called build pyramids of genes (Adillah *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013). This strategy is currently being developed with the help of genetic engineering, but some older varieties that have a combination of major and minor genes, which were generated by traditional methods in Mexico and other countries, have shown to have a lasting resistance (Grünwald *et al.*, 2002; Rietman *et al.*, 2012).

Since Van der Plank (1963) described the concepts of horizontal and vertical resistance, there has been a constant interest in differentiating the horizontal and vertical resistance. The slope of the curve of infection, the development stage of the plants where the first lesions appear, the presence of sporangia in the lesions, and the hypersensitivity reaction in the leaves are some of the parameters that have been used to differentiate the two types of resistance. Of these parameters, the first two have been calculated from the relative area under the curve of infection and have served to classify a large number of clones according to their type of resistance (Marhadour *et al.*, 2013). In previous work carried out under controlled conditions in growth chambers, the response

calculados a partir del área relativa bajo la curva de infección y han servido para clasificar un gran número de clones de acuerdo a su tipo de resistencia (Marhadour *et al.*, 2013). En trabajos previos realizados bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento, se comparó la respuesta a la inoculación con un aislamiento de *P. infestans* en genotipos con y sin genes R (Rubio *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2006). En estos trabajos se observaron los mismos mecanismos de resistencia en ambos grupos de clones, sin embargo, estos resultados deben validarse bajo condiciones naturales de infección de campo en un lugar en donde exista la mayor biodiversidad de razas de *P. infestans*, como es el Valle de Toluca, el cual es considerado el centro de origen de este oomiceto (Goodwin *et al.*, 1992; Grünwald *et al.*, 2001).

La mayor parte de las variedades de papa liberadas en México por el INIFAP poseen una combinación de genes mayores y menores que les confieren resistencia contra *P. infestans* (Flores y Cadena, 1996; Grünwald *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2005). Su evaluación se ha realizado bajo condiciones de campo en el Valle de Toluca, lo cual ha permitido seleccionar algunos cultivares que tienen resistencia duradera, sin embargo, no se han comparado con genotipos que solamente tienen genes menores. El objetivo de este trabajo es realizar esta comparación bajo las condiciones de campo en el Valle de Toluca, con lo cual se espera contribuir al entendimiento de los dos tipos de resistencia y apoyar en la generación de variedades de papa que tengan resistencia duradera contra el tizón tardío. Este conocimiento es de gran importancia en la época actual, en la cual diversos investigadores han emitido opiniones controversiales que favorecen la utilización de pirámides de genes mayores, genes menores o la combinación de ambos (Darsow, 2014).

Material y métodos

Durante 3 años consecutivos (2008-2010) se establecieron experimentos de campo en el Sitio Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Metepec, localizado dentro del Valle de Toluca. En cada ciclo agrícola se compararon 10 clones de papa libres de genes R (resistencia horizontal) contra 10 genotipos con genes R (resistencia vertical). Los primeros fueron generados por el Centro Internacional de la Papa (CIP) y forman parte del grupo conocido como Población B, cuya resistencia horizontal contra *P. infestans* proviene de materiales avanzados libres de genes R, los cuales a su

were compared to inoculation with *P. infestans* isolation in genotypes with and without R genes (Rubio *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2006). In these works the same mechanisms of resistance in both groups of clones were observed, however, these results must be validated under natural field infection in a place where there is the greatest biodiversity of races of *P. infestans*, as is the Valley Toluca, which is considered the center of origin of this oomycete (Goodwin *et al.*, 1992; Grünwald *et al.*, 2001).

Most of the potato varieties released in Mexico by INIFAP possess a combination of major and minor genes that confer resistance to *P. infestans* (Flores and Cadena, 1996; Grünwald *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2005). His evaluation was carried out under field conditions in the Valley of Toluca, which has allowed select some cultivars with durable resistance, however, have not been compared with genotypes that have only minor genes. The aim of this work is to make this comparison under field conditions in the Valley of Toluca, which is expected to contribute to the understanding of the two types of resistance and support the generation of potato varieties that have lasting resistance against blight late. This knowledge is of great importance at the present time, in which several researchers have issued controversial opinions that favor the use of pyramids of major genes, minor genes or a combination of both (Darsow, 2014).

Materials and methods

For 3 consecutive years (2008-2010) field experiments were established in the Experimental Site of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) in Metepec, located in the Valley of Toluca. In each agricultural cycle 10 clones free of R (horizontal resistance) genes versus 10 genotypes with genes R (vertical resistance) they compared potato. The first were generated by the International Potato Center (CIP) and are part of the group known as Population B, whose horizontal resistance against *P. infestans* comes from free advanced materials R genes, which in turn were derived from genotypes higher (R) and minor genes (Landeo, 1995). Clones of the population B used in the present study had already been assessed in previous years in the Experimental Site Metepec INIFAP and were selected for their resistance against late blight, for its performance and overall for its good adaptation to the conditions field in which (unpublished data) were sown. In this selection process they were eliminated from this study clones that cycle very late maturity, this was done to

vez fueron derivados de genotipos con genes mayores (R) y menores (Landeo, 1995). Los clones de la población B utilizados en el presente estudio ya habían sido evaluados en años anteriores en el Sitio Experimental de Metepec del INIFAP y fueron seleccionados por su resistencia contra el tizón tardío, por su rendimiento y en general por su buena adaptación a las condiciones de campo en las que se sembraron (datos no publicados). En este proceso de selección se eliminaron de este estudio los clones que tienen un ciclo de madurez muy tardío, esto se hizo para evitar el sesgo que puede ocasionar la relación que existe entre el nivel de resistencia con la duración del ciclo vegetativo de los genotipos de papa (Bradshaw *et al.*, 2004; Darsow, 2014).

Los genotipos de la población A fueron generados por el INIFAP y su resistencia se basa en la combinación de genes mayores y menores. Entre esta población existen 6 variedades que fueron liberadas previamente y 4 clones que fueron seleccionados por su buena adaptación a las condiciones en las que se cultiva la papa en el Valle de Toluca. En estos materiales, la resistencia contra el tizón tardío de la papa proviene de la especie silvestre *Solanum demissum*, la cual es originaria de México (Fores *et al.*, 1996; Grunwald *et al.*, 2002).

La época de desarrollo del cultivo fue durante el periodo de lluvia en los meses de junio a septiembre, por lo que no se aplicó ningún riego. El diseño experimental fue de bloques al azar con 10 repeticiones. En cada repetición se sembró una planta de cada uno de los 20 genotipos resistentes al tizón tardío (10 de la población A y 10 de la población B) con 1 planta de una variedad susceptible (Alpha) intercalada cada 3 plantas de los genotipos resistentes. Esto se hizo para asegurar una distribución uniforme del tizón tardío en el lote experimental. La distancia entre surcos fue de 92 cm y entre plantas de 30 cm. Durante el desarrollo del cultivo no se aplicó ningún fungicida ni se inocularon las plantas, por lo que la infección de las plantas con *P. infestans* ocurrió de manera natural. En cada planta se observó la fecha en la que apareció la primera lesión provocada por el tizón tardío y posteriormente se hicieron observaciones semanales sobre el progreso de la enfermedad en forma de porcentaje del área foliar infectada. El porcentaje de las lesiones cubiertas por esporas se estimó visualmente durante la época más propicia para la esporulación, la cual estuvo asociada principalmente con la época de mayor frecuencia y cantidad de lluvia. En algunos años se hicieron hasta 3 evaluaciones de esporulación debido a la incertidumbre sobre cuando ocurriría la máxima, pero solo se utilizaron los datos que reportaban los valores máximos.

avoid bias that may cause the relationship between the level of resistance to the duration of the vegetative cycle genotypes Pope (Bradshaw *et al.*, 2004; Darsow, 2014).

The genotypes of the population A were generated by INIFAP and its resistance is based on the combination of major and minor genes. Among this population there are 6 varieties that were previously released and 4 clones were selected for their good adaptation to the conditions under which potatoes are grown in the Valley of Toluca. In these materials, resistance against late blight comes from the wild species *Solanum demissum*, which is native to Mexico (Fores *et al.*, 1996; Grunwald *et al.*, 2002).

The period of crop development was during the period of rain in the months of June to September, so no irrigation was applied. The experimental design was randomized blocks with 10 repetitions. In each repetition plant each of the 20 genotypes resistant to late blight (10 population A and 10 of the population B) 1 plant a susceptible variety (Alpha) intercalated every 3 plants resistant genotypes was planted. This was done to ensure uniform late blight in the experimental batch distribution. Row spacing was 92 cm and 30 cm between plants. During the growing season no fungicide or the plants were inoculated was applied, so that infection with *P. infestans* plant occurred naturally. On each floor the date on which appeared the first injury caused by late blight and later weekly observations on the progress of the disease as a percentage of infected leaf area were observed. The percentage of injuries covered by spores was visually estimated during the most favorable time for sporulation, which was mainly associated with the period of greatest frequency and amount of rainfall. In some years they were made up to 3 sporulation assessments due to uncertainty about when the maximum happen, but only the data that reported the highest values were used.

Each of the 5 variables analyzed in this study [on area under the curve of infection (ARBCI), slope (slope of the linear regression: time vs (%) of infection), (%) of leaf lesions covered by sporangia, number of days after emergence of the plants when the 1st leaf infection and tuber yield (g/plant)] was observed were statistically analyzed using PROC GLM de SAS v9.2. In the analysis of variance (ANOVA) was tested whether there was a difference between genotypes (10 populations A, 10 of the population B and the susceptible variety Alpha), between repetitions in space (10 repetitions in each experiment) and between repetitions time (three years). Statistical analysis of such experiments is described in Steel and Torrie (1980). The ANVA reported significant

Cada una de las 5 variables analizadas en este estudio [área relativa bajo la curva de infección (ARBCI), pendiente (pendiente de la regresión lineal: tiempo vs (%) de infección), (%) de las lesiones foliares cubiertas por esporangios, número de días después de la emergencia de las plantas cuando se observó la 1^{er} infección foliar y el rendimiento de tubérculos (g/planta)] se analizaron estadísticamente utilizando PROC GLM de SAS v9.2. En el análisis de varianza (ANVA) se probó si había diferencia entre genotipos (10 de la población A, 10 de la población B y la variedad susceptible Alpha), entre repeticiones en el espacio (10 repeticiones en cada experimento) y entre repeticiones en el tiempo (3 años). El análisis estadístico de este tipo de experimentos es descrito en Steel and Torrie (1980). El ANVA reportó diferencias significativas entre genotipos, por lo que se procedió a comparar las medias individuales por medio de una prueba de Tukey y las medias entre poblaciones utilizando una prueba de contrastes.

Resultados y discusión

El análisis de varianza demostró que casi todas las fuentes de variación (genotipo, repetición y año) fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en las variables dependientes ARBCI, pendiente, (%) de esporulación, 1^{er} infección foliar y rendimiento de tubérculos, con excepción del efecto de repeticiones y años en el rendimiento. Estos resultados indican que las diferencias climáticas entre años y las diferencias entre los genotipos tuvieron influencia sobre las variables que se utilizaron para evaluar la resistencia contra el tizón tardío en las plantas.

El progreso de la enfermedad durante el desarrollo de las plantas en los tres años de estudio se presenta en la Figura 1, en la cual se puede apreciar que en los años 2008 y 2010, el porcentaje del área foliar infectada fue mayor que en 2009. La cantidad total de precipitación ocurrida durante el periodo de desarrollo de las plantas (junio-septiembre) fue de 657, 684 y 669 mm en los años 2008, 2009 y 2010 respectivamente. Las diferencias en precipitación total durante los 3 años fueron pequeñas, sin embargo en el año 2009 hubo un periodo de baja precipitación entre los días 49 y 63 después de que las plantas emergieron, lo cual hizo que la infección fuera menor en este año. En la Figura 1 también se puede observar una gran diferencia de los genotipos que poseen algún tipo de resistencia (poblaciones A y B) respecto a la variedad Alpha, la cual es susceptible. Sin embargo, la diferencia entre las

differences between genotypes, so we proceeded to compare individual means by Tukey test and means between populations using a test of contrasts.

Results and discussion

The analysis of variance showed that almost all sources of variation (genotype, repetition and year) were statistically significant ($p \leq 0.05$) in the dependent variables ARBCI, slope (%) of sporulation, 1st foliar infection and tuber yield, with except repetitions effect and performance years. These results indicate that climatic differences between years and the differences between genotypes had influence on the variables used to evaluate the resistance against late blight in plants.

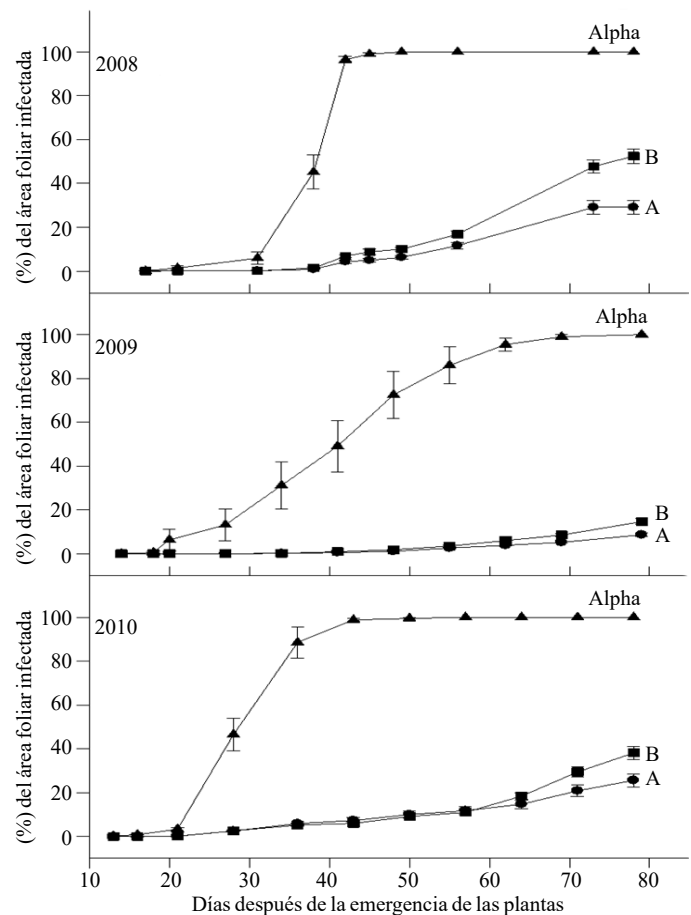


Figura 1. Progreso de la infección foliar por *P. infestans* en genotipos de papa de las poblaciones A, B y en la variedad Alpha en pruebas de campo realizadas en el Valle de Toluca durante 3 años.

Figure 1. Progress of foliar infection by *P. infestans* in potato genotypes of populations A, B and the Alpha variety in field trials conducted in the Toluca Valley for 3 years.

poblaciones A y B es muy pequeña pero significativa al final del ciclo de desarrollo de las plantas, sobre todo en los años con mayor severidad del tizón tardío (2008 y 2010).

Estas curvas del avance de la enfermedad están relacionadas con la forma en que actúan los dos tipos de resistencia. De acuerdo a las observaciones de diversos investigadores (Van der Plank, 1963; Nelson, 1978; Marhadour *et al.*, 2013), se ha establecido que la resistencia horizontal, a base de genes menores, se refleja en una baja pendiente de la curva de infección sin que se presente un incremento brusco que indique que la resistencia ha sido vencida, como ocurre en los genotipos que tienen únicamente genes R. La forma de las curvas de desarrollo de la enfermedad (Figura 1) sugieren que la resistencia de ambas poblaciones no es total y que los mecanismos de defensa en ambas poblaciones son parcialmente vencidos, pero los de la población A son más efectivos que los de la población B para disminuir el desarrollo de la enfermedad. Estas diferencias se deben a que la resistencia de la población B se basa en genes menores (Landeo, 1997) y en la población B existe una combinación de genes mayores y menores (Flores y Cadena, 1996; Grünwald *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2005). Este hecho es apoyado por las diferencias significativas entre las medias de ARBCI, de la pendiente y del tiempo en que se aprecia la primer infección foliar en las poblaciones A y B (Cuadro 1).

The progress of the disease during the development of plants in the three years of study is presented in Figure 1, which can be seen in the years 2008 and 2010 the percentage of infected leaf area was higher than in 2009. The total amount of rainfall that occurred during the development of plants (june-september) was 657, 684 and 669 mm in 2008, 2009 and 2010 respectively. The differences in total precipitation over the 3 years were small, but in 2009 there was a period of low rainfall between days 49 and 63 after the plants emerged, which made infection was lower this year. In Figure 1 you can also see a large difference of genotypes that have some type of resistance (populations A and B) with respect to the Alpha range, which is susceptible. However, the difference between A and B populations is very small but significant at the end of the development cycle of plants, especially in years with greater severity of late blight (2008 and 2010).

These curves of disease progression are related to the way operating the two types of resistance. According to the observations of various researchers (Van der Plank, 1963; Nelson, 1978; Marhadour *et al.*, 2013), it has established that horizontal resistance, based on minor genes, reflected in a low slope of the curve without infection present a sharp increase indicating that the resistance has been overcome,

Cuadro 1. Área relativa bajo la curva de infección (ARBCI), pendiente (pendiente de la regresión lineal: tiempo vs % de infección), % de las lesiones foliares cubiertas por esporangios, número de días después de la emergencia de las plantas cuando se observó la 1^{er} infección foliar y rendimiento de tubérculos (g/planta) de 10 genotipos de la población A, 10 genotipos de la población B y una variedad susceptible (Alpha). Los números son medias de 3 años y 10 repeticiones por año.

Table 1. Relative area under the curve of infection (ARBCI), slope (slope of the linear regression: time vs % infection), % of leaf lesions covered by sporangia, number of days after emergence of the plants when he observed the 1st foliar infection and tuber yield (g/plant) of 10 genotypes of the population a, 10 genotypes of population B and a susceptible variety (Alpha). The numbers are averages of 3 years and 10 repetitions per year.

Población	Clon	Arbci	Pendiente	Esporulación (%)	Días 1 ^{er} infección	Rendimiento
A	Michoacán	0.023 g*	0.172 f	2.79 f	53.7 a	540 cde
A	575015	0.096 cdef	0.763 cd	21.54 bcde	41.0 cdefg	801 abcd
A	Lupita	0.027 g	0.231 f	11.44 def	49.0 abc	898 ab
A	Norteña	0.055 fg	0.292 ef	21.41 bcde	40.2 defgh	610 cde
A	Tollocan	0.047 fg	0.220 f	18.57 bcdef	37.9 efgh	999 a
A	78199-33	0.021 g	0.150 f	11.48 def	47.4 abcd	645 bcde
A	676002	0.039 g	0.240 f	11.70 def	42.0 bcdefg	821 abc
A	Rosita	0.218 b	1.163 b	26.25 bcd	31.9 h	376 ef
A	Montserrat	0.023 g	0.132 f	8.23 ef	50.0 ab	945 a
A	676004	0.040 g	0.269 f	8.70ef	43.3 bcdef	544 cde

*Prueba de Tukey para comparar las medias de los genotipos. Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). **Prueba de contrastes para comparar las medias entre poblaciones y con la variedad Alpha. Medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Cuadro 1. Área relativa bajo la curva de infección (ARBCI), pendiente (pendiente de la regresión lineal: tiempo vs % de infección), % de las lesiones foliares cubiertas por esporangios, número de días después de la emergencia de las plantas cuando se observó la 1^{er} infección foliar y rendimiento de tubérculos (g/planta) de 10 genotipos de la población A, 10 genotipos de la Población B y una variedad susceptible (Alpha). Los números son medias de 3 años y 10 repeticiones por año (Continuación).

Table 1. Relative area under the curve of infection (ARBCI), slope (slope of the linear regression: time vs % infection), % of leaf lesions covered by sporangia, number of days after emergence of the plants when he observed the 1st foliar infection and tuber yield (g/plant) of 10 genotypes of the population a, 10 genotypes of population B and a susceptible variety (Alpha). The numbers are averages of 3 years and 10 repetitions per year (Continuation).

Población	Clon	Arbci	Pendiente	Esporulación (%)	Días 1 ^{er} infección	Rendimiento
Medias Pob. A		0.059 C**	0.362 C	14.2 C	43.67 A	718.5 A
B	391046-60	0.067 efg	0.472 def	18.18 bcdef	41.1 bcdefg	684 abcde
B	391061-44	0.036 g	0.266 f	21.30 bcde	44.2 abcde	793 abcd
B	393295-99	0.039 g	0.277 f	4.72 f	45.5 abcde	694 abcde
B	393295-193	0.115 cde	0.784 cd	29.52 bc	38.2 efgh	744 abcde
B	392785-4	0.061 fg	0.380 ef	15.40 cdef	39.5 defgh	540 cde
B	393295-169	0.092 def	0.659 cde	28.30 bc	37.7 efgh	368 ef
B	393295-162	0.117 cd	0.790 cd	28.30 bc	36.5 fgh	535 de
B	392783-5	0.143 c	1.022 bc	27.24 bcd	35.8 gh	391 e
B	393427-28	0.126 cd	0.819 bcd	32.13 b	37.4 fgh	549 cde
B	39047-3	0.020 g	0.147 f	7.71 ef	50.0 ab	388 e
Medias Pob. B		0.082 B	0.566 B	21.33 B	40.52 B	568.6 B
	Alpha	0.542 a A	3.798 a A	58.50 a A	23.6 i C	43 f C

*Prueba de Tukey para comparar las medias de los genotipos. Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). **Prueba de contrastes para comparar las medias entre poblaciones y con la variedad Alpha. Medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Desde otro punto de vista, la forma parecida en que se desarrolla la enfermedad de las poblaciones A y B (Figura 1), indica la dificultad de separar la resistencia horizontal y vertical debido a la asociación entre los factores que controlan la resistencia. En relación con esto, Stewart *et al.* (2003) demostraron que hay un efecto residual de la resistencia después de que los genes R han sido vencidos por razas compatibles de *P. infestans*. En base a la asociación entre genes R y QTLs, a los que se les atribuye la resistencia vertical y horizontal respectivamente, se ha propuesto que la resistencia horizontal puede ser una expresión de varios genes, incluyendo alelos de genes R, que tienen un efecto complementario sobre la activación de los mecanismos de defensa (Gerbhardt y Valkonene, 2001). En este esquema, la resistencia vertical es el resultado de una coordinación eficiente entre los genes R y aquellos otros genes secundarios que intervienen en la resistencia. Esta propuesta es apoyada por la teoría sobre la cantidad de sensores que se necesitan para iniciar las reacciones de resistencia, la cual se basa en la diferente efectividad que han mostrado los genes R1 y R2 para activar las reacciones de hipersensibilidad (Vleeshouwers *et al.*, 2000).

as in the genotypes having only genes R. the shape of the curves of disease development (Figure 1) suggest that the resistance of both populations is not complete and that the defense mechanisms in both populations are partially overcome, but population a are more effective than population B to decrease the development of the disease. These differences are due to the resistance of the population B is based on minor genes (Landeo, 1997) and population B there is a combination of major and minor genes (Flores and Cadena, 1996; Grünwald *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2005). This fact is supported by the significant differences between the means of ARBCI, the slope and the time when the first foliar infection seen in the A and B populations (Table 1).

From another point of view, much like the disease of A and B (Figure 1) populations develops it indicates the difficulty of separating the horizontal and vertical resistance due to the association between factors controlling resistance. In this connection, Stewart *et al.* (2003) demonstrated that there is a residual effect of the resistance R after the genes have been overcome by compatible races of *P. infestans*.

En este caso, un incremento en los receptores puede aumentar la sensibilidad para detectar y controlar el patógeno, por lo tanto, la variación alelica puede regular los receptores de la planta y consecuentemente afectar la respuesta de defensa. Por el lado del patógeno, Vleeshouwers *et al.* (2011) han descrito los mecanismos que *P. infestans* utiliza para que las sustancias que secreta al invadir a su hospedero, no sean detectadas por las proteínas que son producidas en la planta por efecto de los genes R. En base a estos mecanismos de resistencia, se asume que los clones de la población A utilizados en el presente estudio, tienen varios genes mayores y menores de resistencia, cuyo efecto aditivo los hace más resistentes que los clones de la población B, en los que supuestamente no existen genes R, pero en los cuales pueden existir sus alelos que los hacen reaccionar de manera similar pero menos efectiva que los genotipos de la población A.

Puesto que el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre genotipos, el siguiente paso fue la comparación de sus medias. En el cuadro 1 se presentan las medias de las 5 variables por genotipo y por población. En este cuadro se puede apreciar que de acuerdo al área relativa bajo la curva de infección (ARBCI) y de la pendiente, todos los clones de ambas poblaciones son más resistentes al tizón tardío que la variedad Alpha. En ambas poblaciones (A y B) existe un amplio rango de niveles de resistencia, siendo los genotipos 78199-33, Montserrat, Michoacán, Lupita, 676002, 676004, Tollocan y Norteña los más resistentes de la población A. En la población B los clones más resistentes son: 3947-3, 391061-44 y 393295-99. La comparación de las medias de las 5 variables por población (Cuadro 1) permite establecer una amplia superioridad de los genotipos que poseen algún tipo de resistencia (poblaciones A y B) sobre la variedad Alpha, la cual es susceptible. Sin embargo, las diferencias entre las poblaciones A y B son estrechas, pero significativas e indican mayor resistencia y rendimiento de los genotipos de la población A que los genotipos de la población B. El mayor rendimiento de la población A se asocia a la menor infección en el follaje, por lo que existe una mayor cantidad de fotosintatos que son producidos en la parte aérea de la planta y trasladados hacia los tubérculos.

La mayor resistencia de la población A no puede ser atribuida a la duración del ciclo vegetativo de las plantas, ya que en las dos poblaciones no hubo genotipos que se consideren muy tardíos. Es de conocimiento general que entre mayor es la duración del ciclo vegetativo de la planta mayor es la resistencia contra el tizón tardío de la papa (Bradshaw *et al.*, 2004; Darsow, 2014). Esta relación es más clara en

Based on the association between R and QTLs genes, which are attributed the vertical and horizontal resistance respectively has been proposed that horizontal resistance can be an expression of several genes including alleles R genes, which have a complementary effect on the activation of defense mechanisms (Gebhardt and Valkonene, 2001). In this scheme, vertical resistance is the result of efficient coordination between R genes and those genes involved in secondary resistance. This proposal is supported by the theory on the number of sensors needed to initiate the reactions of resistance, which is based on the different effectiveness shown by the R1 and R2 genes to trigger hypersensitivity reactions (Vleeshouwers *et al.*, 2000).

In this case, an increase in receptors may increase the sensitivity to detect and control the pathogen, therefore allelic variation can regulate receptors and consequently affect the plant defense response. On the side of the pathogen, Vleeshouwers *et al.* (2011) have described the mechanisms *P. infestans* used to the substances secreted by invading its host, they are not detected by proteins that are produced in the plant by effect of R. genes Based on these resistance mechanisms it is assumed that the clones of the population a used in this study, have several major and minor resistance genes and whose additive effect makes them more resistant clones of the population B, where supposedly there is no R genes, but in which their alleles may exist that reacted similarly but less effective than the genotypes of the population A.

Since the analysis of variance indicated significant differences among genotypes, the next step was comparing her stockings. Table 1 shows the mean of the 5 variables are presented by genotype and population. In this picture we can see that according to the relative area under the curve of infection (ARBCI) and slope, all clones of both populations are more resistant to late blight the variety Alpha. In both populations (A and B) there is a wide range of resistance levels, being the genotypes 78199-33, Montserrat, Michoacan, Lupita, 676,002, 676,004, Tollocan and Norteña the toughest of the population A. In population B the more resistant clones are: 3947-3, 391061-44 and 393295-99. The comparison of the mean population 5 variables (Table 1) allows for a wide superiority of genotypes that have some type of resistance (populations A and B) on the Alpha variety, which is susceptible. However, the differences between the A and B populations are narrow, but significant and indicate strength and performance of the genotypes of the population to the population genotypes

genotipos con resistencia horizontal, sin embargo, estudios moleculares recientes han demostrado que pueden existir algunos QTLs, que confieren resistencia, pero que no están ligados a los genes que confieren una madurez tardía de las plantas (Danan *et al.*, 2011). Desafortunadamente no se han hecho estudios que permitan definir los genes R y QTLs que poseen los materiales de la población A utilizados en este estudio. Esta información, junto con técnicas modernas de ingeniería genética, podría servir para hacer más eficiente el proceso de generación y selección de genotipos con alto nivel de resistencia que no sea vencida en un corto plazo.

En el presente estudio se observó que la población B presentó mayor porcentaje de esporulación que la población A (Cuadro 1). La menor esporulación observada en la población A se puede explicar si se considera que la resistencia está basada en una combinación de genes mayores y menores; por lo tanto su efecto de resistencia es mayor que cuando solo se tienen genes menores. Esta explicación se apoya en los conceptos de Van der Plank (1963), quien mencionó que los genotipos con resistencia vertical muestran una reducción inicial de la esporulación debido a la acción de los genes R, pero una vez que la resistencia es vencida, la cantidad de inóculo aumenta rápidamente. Por lo contrario, los genotipos con resistencia horizontal se caracterizan por una disminución de la esporulación durante todo su ciclo debido a la acción conjunta de varios genes menores (Niederhauser, 1961; James and Fry, 1983). Por lo tanto, al combinar ambos tipos de resistencia es de esperarse una menor esporulación en la población A.

Observaciones adicionales hechas durante el desarrollo de las plantas indican que todos los genotipos en este estudio presentaron en alguna etapa de su desarrollo reacciones de hipersensibilidad (RH), la cual consiste en pequeñas aéreas necróticas que aparecen en las hojas como resultado de la muerte programada de las células para evitar la expansión de la infección. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de Gees and Hohl (1988), quienes demostraron que la RH puede presentarse indistintamente en plantas de papa con resistencia vertical y horizontal. Otros investigadores (Vleeshowers *et al.*, 2000) observaron que la RH no es exclusiva de genotipos con genes R sino que también puede presentarse en especies silvestres de papa con varios niveles de resistencia contra el tizón tardío, sin embargo, en este caso, la velocidad y efectividad de la RH para controlar la infección fue asociada con los niveles de resistencia de los diferentes genotipos. Por lo tanto, la RH establecida inicialmente por Van der Plank (1963) para distinguir la resistencia horizontal y vertical no puede ser considerada válida en todos los casos.

B. The highest yield of the population A is associated with lower infection in the foliage, so there is a greater amount of photosynthate that are produced in the aerial part of the plant and transported to tubers.

The greatest resistance population A cannot be attributed to the length of the growing cycle of plants, since in the two populations were no genotypes that are considered very late. It is generally known that the higher the duration of the vegetative cycle of the plant is increased resistance against late blight of potato (Bradshaw *et al.*, 2004; Darsow, 2014). This relationship is clearer in genotypes with horizontal resistance, however, recent molecular studies have shown that there may be some QTLs that confer resistance, but are not linked to genes conferring late maturity of plants (Danan *et al.*, 2011). Unfortunately there have been no studies to define the R genes and QTLs possessing materials to the population used in this study. This information, along with modern genetic engineering techniques, could serve to make the process of generation and selection of genotypes with high level of resistance not be overcome in the short term more efficient.

In the present study found that the population B sporulation highest percentage of the population A (Table 1). The lower sporulation observed in population A can be explained considering that the resistance is based on a combination of major and minor genes; therefore its resistance effect is greater than when only have minor genes. This explanation is based on the concepts of Van der Plank (1963), who mentioned that genotypes with vertical resistance show an initial reduction of sporulation due to the action of the R genes, but once the resistance is overcome, the amount inoculum increases rapidly. In contrast, with horizontal resistance genotypes are characterized by a reduction of sporulation throughout its cycle due to the joint action of several minor genes (Niederhauser, 1961; James and Fry, 1983). Therefore, by combining both types of resistance is to be expected a smaller population sporulation in A.

Additional observations made during plant development indicate that all genotypes in this study had at some stage of their development hypersensitivity reactions (RH), which consists of air small necrotic appearing on the leaves as a result of programmed death cells to prevent the spread of infection. These results are consistent with the work of Gees and Hohl (1988), who showed that the RH can occur either in potato plants with vertical and horizontal resistance. Other

Es importante señalar que algunos progenitores de la población B provienen de genotipos con genes R (Landeo, 1997). De acuerdo con este investigador, el proceso de mejoramiento genético para seleccionar genotipos libres de genes R se basó en la ausencia de la RH cuando los clones fueron inoculados con la raza 0 de *P. infestans*. Sin embargo, se ha demostrado que algunos genotipos sin genes R pueden mostrar la RH con la raza 0 (Gees and Hohl, 1988; Vleeshowers *et al.*, 2000). Por otro lado, se desconoce cuál podría ser la reacción de las plantas que poseen genes R desconocidos. La incertidumbre de la prueba para separar genotipos con y sin genes R utilizando la reacción a la raza 0 de *P. infestans*, el comportamiento parecido de las curvas de desarrollo de la enfermedad de las poblaciones A y B en este estudio y la asociación entre genes R y QTLs, abren la posibilidad de que los clones de la población B tengan genes R.

Los resultados en el presente trabajo realizado bajo condiciones de campo, concuerdan con estudios previos realizados bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento (Rubio *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2006). En dichos estudios se compararon dos variedades de la población A y dos clones de la B inoculados con una raza de *P. infestans*, y los resultados indicaron mayor resistencia en los genotipos de la población B. Es importante hacer notar que las pruebas realizadas en el presente trabajo con más genotipos y repetidas durante 3 años bajo condiciones de campo en el Valle de Toluca, dan mayor certeza a los resultados. La gran biodiversidad de razas de *P. infestans* que se encuentra en el Valle de Toluca da seguridad al proceso de evaluación de la resistencia. Los resultados de Blackburn *et al.* (2007) demuestran que el uso de razas complejas de *P. infestans* permiten distinguir genotipos con resistencia horizontal y vertical. En nuestro estudio, los materiales fueron sometidos a condiciones de campo en un lugar en el que existe una gran biodiversidad de razas de *P. infestans* (Goodwin *et al.*, 1992; Grünwald *et al.*, 2001).

La durabilidad de la resistencia solamente puede ser evaluada cuando una variedad es sembrada por varios años en un lugar en donde exista una gran biodiversidad de razas de *P. infestans*, como lo es el Valle de Toluca. La durabilidad de la resistencia de las variedades de la población A (Tollocan, Montserrat, Norteña, Michoacán y Rosita) utilizadas en el presente estudio, ha sido demostrada previamente bajo las condiciones del Valle de Toluca (Grünwald *et al.*, 2002). Esto confirma que el proceso de mejoramiento genético del programa de papa del INIFAP ha sido, hasta el momento, un sistema adecuado para seleccionar genotipos resistentes y estables.

researchers (Vleeshowers *et al.*, 2000) found that the RH is not unique genotypes with R genes but may also occur in wild potato species with various levels of resistance to late blight, however, in this case, speed and effectiveness of RH to control infection was associated with resistance levels of different genotypes. Therefore, the RH initially by Van der Plank (1963) for distinguishing valid horizontal and vertical resistance cannot be considered in all cases.

It is important to note that some parents of the population B come from genotypes R genes (Landeo, 1997). According to this researcher, the breeding process to select free genotypes of R genes was based on the absence of the RH when clones were inoculated with race 0 of *P. infestans*. However, it has been shown that some genotypes without R genes may show RH with race 0 (Gees and Hohl, 1988; Vleeshowers *et al.*, 2000). Furthermore, it is unknown what could be the reaction of plants possessing genes R unknown. The uncertainty of the test to separate genotypes with and without R genes using the reaction to race 0 of *P. infestans*, the similar behavior of the curves of development of disease A and B in this study population and the association between genes R and QTLs, opening the possibility that the clones of the population B have genes R.

The results in this work performed under field conditions, consistent with previous studies conducted under controlled conditions in growth chambers (Rubio *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2006). In these studies two varieties of the population A and two B clones inoculated with a race of *P. infestans* were compared, and the results indicated greater resistance in the genotypes of the population B. It is important to note that the tests conducted in this work with more genotypes and repeated for 3 years under field conditions in the Toluca Valley, give greater certainty to the results. The great biodiversity of *P. infestans* races found in the Toluca Valley reassures the evaluation process of resistance. The results of Blackburn *et al.* (2007) show that the use of complex races of *P. infestans* distinguish genotypes with horizontal and vertical resistance. In our study, the materials were subjected to field conditions in a place where there is great biodiversity of races of *P. infestans* (Goodwin *et al.*, 1992; Grünwald *et al.*, 2001).

The durability of resistance can only be evaluated when a variety is planted for several years in a place where there is great biodiversity of *P. infestans* races, as is the Valley of Toluca. The durability of the resistance of the varieties of the population A (Tollocan, Montserrat, Northern, Michoacan

Conclusión

Los resultados de este estudio demuestran que los genotipos de papa de la población A (con resistencia vertical) tienen mayor resistencia que los de la población B (con resistencia horizontal). La población A mostró superioridad en la resistencia evaluada por 5 variables: área relativa bajo la curva de infección (ARBCI), pendiente (pendiente de la regresión lineal: tiempo vs % de infección), % de las lesiones foliares cubiertas por esporangios, número de días después de la emergencia de las plantas cuando se observó la 1^{er} infección foliar y el rendimiento de tubérculos. La combinación de genes mayores y menores de la población A, ha permitido crear genotipos con alto nivel de resistencia, que además puede ser duradera. La selección de materiales bajo las condiciones naturales de infección en el Valle de Toluca, en donde existe la mayor biodiversidad de razas de *P. infestans*, ha sido una estrategia adecuada para seleccionar variedades de papa resistentes al tizón tardío.

Literatura citada

- Adillah, T. M. Y.; Hutten, R. C. B.; Visser, R. G. F. and Van Eck, H. J. 2010. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes RPi-mcd1 and RPi-ber in potato. *Theor. Appl. Genet. USA*. 121(1):117-125.
- Blackburn, S. R. M.; Stewart, H. E. and Bradshaw, J. E. 2007: Distinguishing major-gene from field resistance to late blight *Phytophthora infestans* of potato *Solanum tuberosum* and selecting for high levels of field resistance. *Theor. Appl. Genet.* 115(1):141-149.
- Bradshaw, J. E.; Pande, B.; Bryan, G. J.; Hackett, C. A.; McLean, K.; Stewart, H. E. and Waugh, R. 2004. Interval mapping of quantitative trait loci for resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], height and maturity in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Genetics*. 168(2):983-995.
- Danan, S.; Veyrieras, J. B. and Lefebvre, V. 2011. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. *BMC Plant Biol.* 11(1):1-16.
- Darsow, Ulrich. 2014. Pre-breeding and breeding of potatoes for quantitative resistance to *Phytophthora infestans* on foliage and tubers and for different utilization-problems, solutions and results. Julius Kühn-Institut. Germany. 312 p.
- Flores, G. F. X. and Cadena, H. M. A. 1996. Evaluation of horizontal resistance and effects of R-genes in ten Mexican cultivars against potato late blight (*Phytophthora infestans*) under natural conditions in the central plateau of Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol. México*. 102(1):97-102.

and Rosita) used in this study has been previously demonstrated under the conditions of the Toluca Valley (Grunwald *et al.*, 2002). This confirms that the process of genetic improvement of potato program INIFAP has been, so far, an adequate system to select genotypes resistant and stable.

Conclusion

The results of this study demonstrate that potato genotypes of the population A (vertical resistance) have greater resistance than population B (horizontal resistance). The population showed superior resistance evaluated by five variables: relative area under the curve of infection (ARBCI), slope (slope of the linear regression: time vs % infection), % of leaf lesions covered by sporangia, number of days after emergence of the plants when the 1st leaf infection and tuber yield was observed. The combination of major and minor population A genes and genotypes has created high level of resistance, which can be long-lasting. The selection of materials under natural conditions of infection in the Valley of Toluca, where there is the greatest biodiversity of races of *P. infestans*, has been an appropriate strategy to select varieties resistant to late blight.

End of the English version



- Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39(1):79-102.
- Gees, R. and Hohl, H. R. 1998. Cytological comparison of specific (R3) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. *Phytopathol.* 78(3):350-357.
- Goodwin, S. B.; Spielman, L. J.; Matuszak, J. M.; Bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathol.* 82(9):955-961.
- Grünwald, N. J.; Cadena, H. M. A.; Rubio, C. O. A.; Rivera, P. A.; Niederhauser, J. S. and W. E. Fry. 2002. Potato cultivars from the Mexican national program: sources and durability of resistance against late blight. *Phytopathol.* 92(7):688-693.
- Grünwald, N. J.; Flier, W. G.; Sturbaum, A. K.; Garay S. E.; Van Den Bosch, T. B. M.; Smart, C. D.; Matuszak, J. M.; Lozoya S. H.; Turkensteen, L. J. and Fry, W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathol.* 91(9):882-890.
- Haverkort, A.; Struik, P.; Visser, R. and Jacobsen, E. 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 52(3):249-264.

- James, R.V. and Fry, W. E. 1983. Potential for *Phytophthora infestans* populations to adapt to potato cultivars with rate-reducing resistance. *Phytopathol.* 73(7):984-988.
- Kim, H. J.; Lee, H. L.; Jo, K. R.; Mortazavian, S. M. M.; Huigen, D. J.; Evenhuis, B.; Kessel, G.; Visser, R. G. F.; Jacobsen, E. and Vossen, J. H. 2012. Presence of the potato late blight resistance gene *RB* does not promote adaptive parasitism of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* 124:923-935.
- Landeo, J. A. 1997. Strategies on breeding for resistance to late blight in potato at CIP. *In: Memorias del Simposium Internacional de la papa.* INIFAP. Toluca, México. 9-17 p.
- Landeo, J. A.; Gastelo, M.; Pinedo, H. and Flores, F. 1995. Breeding for horizontal resistance to late blight in potato free of R-genes. *In: Dowley, L. J.; Bannan, E.; Cooke, L. R.; Keane, T. and O'Sullivan, E. (Eds.). Phytophthora infestans.* Dublin Boole Press. Dublin, Germany. 268-274 pp.
- Marhadour, S.; Pellé, R.; Abiven, J. M.; Aourousseau, F.; Dubreuil, H.; Hingrat, Y. L. and Chauvin, J. E. 2013. Disease progress curve parameters help to characterise the types of resistance to late blight segregating in cultivated potato. *Potato Res.* 56(2):99-114.
- Nelson, R. R. 1978. Genetics of horizontal resistance. *Annual Rev. Phytopathol.* 16(1):359-378.
- Niederhauser, J. S. 1961. Genetic studies of *Phytophthora infestans* and *Solanum* species in relation to late-blight resistance in potato. *Recent Adv. Bot.* 1:491-497.
- Rietman, H.; Bijsterbosch, G.; Cano, L. M.; Lee, H. R.; Vossen, J. H.; Jacobsen, E.; Visser, R. G. F.; Kamoun, S. and Vleeshouwers, V. G. A. A. 2012. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar sarpomira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol. Plant Microb Int.* USA. 25(7):910-919.
- Rubio, C. O. A.; Rangel, G. J. A.; Flores, L. R.; Magallanes, G. J. V.; Díaz, H. C.; Zavala, Q. T. E.; Rivera, P. A.; Cadena, H. M. A.; Rocha, R. R.; Ortíz, T. C.; López, D. H.; Díaz, V. M. y Paredes, T. A. 2000. Manual para la producción de papa en las sierras y valles altos del centro de México. Libro técnico No. 1. Campo Experimental Valle de Toluca, CIRCE-INIFAP. Toluca, Mexico. 61 p.
- Rubio, C. O. A.; Douches, D. S.; Hammerschmidt, R.; Da Rocha, A. and Kirk, W. W. 2005. Effect of temperature and photoperiod on symptoms associated with resistance to *Phytophthora infestans* after leaf penetration in susceptible and resistant potato cultivars. *Am. J. Potato Research.* 82(2):139-146.
- Rubio, C. O. A.; Douches, D. S.; Hammerschmidt, R.; Da Rocha, A. and Kirk, W. W. 2006. Effect of photoperiod and temperature on resistance against *Phytophthora infestans* in susceptible and resistant potato cultivars: effect on deposition of structural phenolics on the cell wall and resistance to penetration. *Am. J. Potato Res.* 83(4):325-334.
- SAS Institute. 2012. SAS release 9.3 ed. SAS Institute, SAS. Cary, NC, USA. 320 p.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. Second edition. McGraw-Hill, Inc. USA. 633 p.
- Stewart, H. E.; Bradshaw, J. E. and Pande, B. 2003. The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathol.* 52(2):193-198.
- Turkensteen, L. J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. *In: Jacobs, T. and Parlevliet, J. E. (Eds.). Durability of disease resistance.* Kluwer academic publishers. The Netherlands. 115-124 pp.
- Van der Plank, J. E. 1963. Plant diseases: epidemics and control. Academic Press, New York. USA. 349 p.
- Vleeshouwers, V. G. A. A.; Van Dooijeweert, W.; Govers, F.; Kamoun, S. and Colon, L. T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta.* 210(6):853-864.
- Vleeshouwers, V. G. A. A.; Raffaele, S.; Vossen, J. H.; Champouret, N.; Oliva, R.; Segretin, M. E.; Rietman, H.; Cano, L. M.; Lokossou, A.; Kessel, G.; Pel, M. A. and Kamoun, S. 2011. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Rev. Phytopathol.* 49:507-31.
- Zhu, S.; Duwal, A.; Su, Q.; Vossen, J. H.; Visser, R. G. F. and Jacobsen, E. 2013. Vector integration in triple *R* gene transformants and the clustered inheritance of resistance against potato late blight. *Transgenic Res.* 22(2):315-325.