

FENOLES, PEROXIDASA Y FENILALANINA AMONIO-LYASA: SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA GENÉTICA DE CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CONTRA EL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary)

PHENOLS, PEROXIDASE AND PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE: THEIR RELATIONSHIP TO THE GENETIC RESISTANCE AGAINST LATE BLIGHT (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) CLONES

Héctor Lozoya-Saldaña, Rodolfo Rivera-Hinojosa y María Teresa Colinas-León

Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (lozoya@correo.chapingo.mx) (mtcolina@correo.chapingo.mx)

RESUMEN

La resistencia horizontal de las plantas a las enfermedades involucra la activación de varios genes de defensa. Para comprobar este tipo de mecanismos se cuantificaron actividades enzimáticas relacionadas con diversos niveles de resistencia genética en genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), expuestos a infección natural en el valle de Toluca, con y sin protección con fungicidas. Hubo respuesta diferencial en presencia y actividad enzimática entre genotipos en función de su resistencia genética y de la presencia o ausencia de fungicidas. En el cultivar Alpha, susceptible, sin fungicidas, hubo correlación positiva significativa entre el nivel de la infección y la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), así como de fenoles-peroxidasa (FEN-POX; $r=0.9$ en ambos casos), mientras que con protección química los fenoles se correlacionaron positivamente con ambas enzimas. En los clones resistentes hubo correlación positiva directa entre el porcentaje de infección y la presencia de fenoles, con y sin fungicidas, pero no se observó la relación inversa esperada (a mayor cantidad de fenoles menor infección). También en los genotipos resistentes (cv. Zafiro y los clones), sin fungicidas, hubo correlación positiva significativa entre infección/POX, FEN/POX y POX/PAL. Además, con fungicidas, los clones mostraron correlación positiva significativa entre todas las variables y sus combinaciones ($r > 0.73$; Infección, FEN, POX, PAL). Se concluye que la resistencia genética no fue el resultado de reacciones aisladas contra el patógeno, sino de la combinación de los factores estudiados, sugiriendo el carácter poligénico o de resistencia horizontal.

Palabras clave: FEN, papa, PAL, POX, resistencia genética.

INTRODUCCIÓN

El tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) es una de las enfermedades más devastadoras de ese cultivo (Fry y

Recibido: Noviembre, 2006. Aprobado: Febrero, 2007.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 479-489. 2007.

ABSTRACT

Horizontal resistance to diseases in plants involves activation of several defense genes. In order to prove this type of mechanism, a quantification was made of enzymatic activities related to diverse levels of genetic resistance in potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) against late blight (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary), exposed to natural infection in the Toluca Valley, with and without protection with fungicides. There was a differential response in enzymatic presence and activity among genotypes as a function of their genetic resistance and of the presence or absence of fungicides. In the Alpha cultivar, susceptible, without fungicides, there was significant positive correlation between the infection level and the activity of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL), as well as of phenols-peroxidase (FEN-POX; $r=0.9$ in both cases), whereas with chemical protection, the phenols were positively correlated with both enzymes. In the resistant clones there was direct positive correlation between the percentage of infection and the presence of phenols, with and without fungicides, but the expected inverse relationship was not observed (the higher the amount of phenols, the lower the infection). Also, in the resistant genotypes (cv. Zafiro and the clones), without fungicides, there was significant positive correlation among infection/POX, FEN/POX and POX/PAL. Furthermore, with fungicides, the clones showed significant positive correlation among all of the variables and their combinations ($r > 0.73$; Infection, FEN, POX, PAL). It is concluded that the genetic resistance was not the result of isolated reactions against the pathogen, but rather of the combination of the factors studied, suggesting the polygenic trait or horizontal resistance.

Key words: FEN, potato, PAL, POX, genetic resistance.

INTRODUCTION

The late blight of potato (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) is one of the most devastating diseases of this crop (Fry and Goodwin, 1997); thus, some genetic breeding programs for resistance to this oomycete have been followed by studies of the

Goodwin, 1997), por lo que algunos programas de mejoramiento genético para resistencia a este oomiceto se han acompañado de estudios sobre la interacción hospedero patógeno (Andreu *et al.*, 2000; Mucharromah *et al.*, 1995; Trujillo *et al.*, 2001). Los patógenos generan alteraciones metabólicas adversas que inducen síntesis de enzimas de defensa en la planta, ya sea en torno a los sitios de infección u obstruyendo el establecimiento del agente adverso. La fenilalanina amonio-liasa (PAL) regularmente exhibe mayor actividad o síntesis *de novo* en los tejidos enfermos o en genotipos resistentes, y es precursora de la mayoría de los compuestos fenólicos (FEN), entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Dixon y Harrison, 1991). La síntesis de estas sustancias se relaciona con el nivel de resistencia genética de la papa al oomiceto (Andreu *et al.*, 2000). La peroxidasa (POX) interviene en reacciones peroxidativas y oxidativas, además de la lignificación de la pared celular y en la degradación del ácido idolacético (Robinson, 1991). Si los genotipos de papa expuestos a la infección natural no son atacados por la gran diversidad de razas del patógeno presentes en el valle de Toluca (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2005), entonces dicha resistencia se considera multigénica (Niederhauser, 1962), pero hasta ahora esta característica, observada por años, no se ha respaldado con la evidencia de la activación de genes específicos de defensa para interpretar dicha resistencia.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue cuantificar las respuestas de defensa en clones y variedades de papa con diversos grados de resistencia genética a *P. infestans*, al ser expuestos a su infección natural en el valle de Toluca, México, con y sin fungicidas, en cuanto a los cambios en presencia y actividad (o la activación de los genes) de PAL, POX y FEN. La hipótesis fue que la actividad de las enzimas estudiadas, así como la concentración de fenoles totales, son mayores en los genotipos resistentes que en los susceptibles, y que dicha activación demuestra el carácter poligénico de la resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el verano de 2003, bajo condiciones de temporal y de infección natural por *P. infestans*, se estableció el ensayo con un diseño experimental de bloques completos al azar. Los tratamientos fueron cinco genotipos de papa: cv. Alpha, susceptible; cv. Zafiro, medianamente resistente; y los clones A00499-5, A00502-3, y A00531-21, resistentes al tizón tardío; con o sin aspersión de fungicidas (mancozeb, 3 kg ha⁻¹ y Dimetomorf, 2.5 kg ha⁻¹, una aspersión alternada de cada uno por semana). Hubo diez tratamientos con cuatro repeticiones, y la unidad experimental fue un surco de 12 m. Las variables evaluadas se describen a continuación:

host pathogen interaction (Andreu *et al.*, 2000; Mucharromah *et al.*, 1995; Trujillo *et al.*, 2001). The pathogens generate adverse metabolic alterations that induce synthesis of defense enzymes in the plant, whether around the infection sites or obstructing the establishment of the adverse agent. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) regularly exhibits greater activity or *de novo* synthesis in the diseased tissues or in resistant genotypes, and is a precursor of most of the phenolic compounds (FEN), including the phytoalexins and lignine (Dixon and Harrison, 1991). The synthesis of these substances is related with the level of genetic resistance of the potato to the oomycete (Andreu *et al.*, 2000). Peroxidase (POX) intervenes in peroxydative and oxidative reactions, as well as in the lignification of the cell wall and in the degradation of the indolacetic acid (Robinson, 1991). If the potato genotypes exposed to the natural infection are not attacked by the great diversity of races of the pathogen present in the Valley of Toluca (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2005), then this resistance is considered multigenic (Niederhauser, 1962), but until now this characteristic, observed for years, has not been supported with the evidence of the activation of specific genes of defense to interpret this resistance.

Therefore, the objective of the present study was to quantify the defense responses in clones and varieties of potato with diverse levels of genetic resistance to *P. infestans*, when exposed to natural infection in the Toluca Valley, México, with and without fungicides, regarding the changes in the presence and activity (or activation of the genes) of PAL, POX and FEN. The hypothesis was that the activity of the enzymes studied as well as the concentration of total phenols, are higher in the resistant genotypes than in the susceptible ones, and that this activation demonstrates the polygenic character of the resistance.

MATERIALS AND METHODS

During the summer of 2003, under rainfed conditions and natural infection by *P. infestans*, the assay was established with an experimental design of complete randomized blocks. The treatments were five potato genotypes: cv. Alpha, susceptible; cv. Zafiro, moderately resistant; and the clones A00499-5, A00502-3, and A00531-21, resistant to late blight; with or without spraying of fungicides (mancozeb, 3 kg ha⁻¹ and Dimetomorf, 2.5 kg ha⁻¹, a spraying alternated of each one per week). There were ten treatments with four replicates, and the experimental unit was a row of 12 m. The evaluated variables are described below:

Progress of the disease

Weekly readings were taken of foliar infection, based on the Henfling scale (Henfling, 1987).

Progreso de la enfermedad

Se hicieron lecturas semanales de infección foliar, con base en la escala de Henfling (1987).

Polvo de acetona

Este procedimiento no genera una variable, pero es la base para el análisis posterior de las variables químicas. A 30 d después de la siembra se tomaron al azar 20 g de foliolos, manteniéndolos a 4 °C. Este procedimiento se repitió en cada una de seis semanas. La muestra, con 50 mL de acetona 100% (4 °C) se molió en licuadora y se filtró al vacío separándose la acetona o sobrenadante de la pasta. Ésto se repitió dos veces más con el mismo tejido y se dejó secar a temperatura ambiente, quedando la muestra como polvo de acetona, seguida de almacenamiento a -4 °C hasta los ensayos posteriores (Alia-Tejagal *et al.*, 2002).

Fenoles totales

Se utilizó para determinar el sobrenadante de acuerdo con el método de Folin y Ciocalteu, (Waterman y Mole, 1994). A 0.03 mL del sobrenadante se agregaron 16.97 mL de agua desionizada y 1 mL de Folin-Ciocalteu con 2 mL de carbonato de sodio al 20%; se agitó, se dejó 2 h en la oscuridad y se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy). La cuantificación se hizo con una curva patrón de ácido tánico y se reportó la concentración (mg fenoles totales g⁻¹ peso fresco de tejido).

Peroxidasa EC 1.11.1.7 (POX)

Su actividad se determinó con la metodología modificada de Alia-Tejagal *et al.* (2002). La enzima se extrajo de 0.1 g de polvo de acetona con 5 mL de Tris-HCl frío, pH 7.1, conteniendo 1% de polivinilpirrolidona. Se homogenizó por 50 s y la mezcla se centrifugó 20 min a 12 500 rpm y 4 °C. El sobrenadante se usó para el ensayo de acuerdo con Flurkey y Jen (1978). La mezcla de ensayo tuvo un volumen total de 3 mL, con 2.6 mL de amortiguador Tris-HCl (pH 7.1), 0.25 mL de guayacol 0.1 M, 0.1 mL de peróxido de hidrógeno 0.25% y 0.05 mL del sobrenadante. Se evaluó el cambio de absorbancia a 30, 60, 120 y 180 s a 470 nm. La actividad enzimática se reportó como Ug de peso fresco (U es la Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol min⁻¹ de tetraguayacol).

Fenilalanina amonio-liasa EC 4.3.1.5 (PAL)

Se extrajo con el método descrito por Martínez-Tellez y Lafuente (1997). Se mezcló 0.1 g de polvo de acetona con 5 mL de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) frío con 20 mM b-mercaptoetanol, en el homogenizador de tejidos por 50 s. Se agitó la mezcla 20 min en baño con hielo (4 °C), se filtró con malla de tela y se centrifugó a 12 500 rpm a 4 °C 20 min. Se extrajo el sobrenadante, la enzima se precipitó agregando 0.46 g de sulfato de amonio por mL de

Acetone powder

This procedure does not generate a variable, but it is the base for the later analysis of the chemical variables. At 30 d after sowing, 20 g of leaflets were taken randomly, and maintained at 4 °C. This procedure was repeated in each of six weeks. The sample, with 50 mL of acetone 100% (4 °C), was ground in a blender and vacuum filtered, separating the acetone or supernatant from the paste. This was repeated two more times with the same tissue and was left to dry at room temperature, leaving the sample as acetone powder, followed by storage at -4 °C until the later assays were made (Alia-Tejagal *et al.*, 2002).

Total phenols

This variable was used to determine the supernatant according to the method of Folin and Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994). To 0.03 mL of the supernatant, 16.97 mL of de-ionized water and 1 mL of Folin-Ciocalteu were added with 2 mL of sodium carbonate at 20%; the mixture was agitated, then left for 2 h in darkness, and the absorbance was read at 760 nm in a Spectronic 21D (Milton Roy) spectrophotometer. The quantification was carried out with a pattern curve of tannic acid, and the concentration was reported (mg total phenols g⁻¹ fresh weight of tissue).

Peroxydase EC 1.11.1.7 (POX)

Its activity was determined with the modified methodology of Alia-Tejagal *et al.* (2002). The enzyme was extracted from 0.1 g of acetone powder with 5 mL of cold Tris-HCl, pH 7.1, containing 1% of polyvinylpyrrolidone. It was homogenized during 50 s and the mixture was centrifuged 20 min at 12 500 rpm and 4 °C. The supernatant was utilized for the assay according to Flurkey and Jen (1978). The assay mixture had a total volume of 3 mL, containing 2.6 mL of Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.25 mL of guayacol 0.1 M, 0.1 mL of hydrogen peroxide 0.25% and 0.05 mL of the supernatant. The change of absorbance was evaluated at 30, 60, 120 and 180 s at 470 nm. The enzymatic activity was reported as Ug of fresh weight (U is the Unit of enzymatic activity and one unit is equal to the formation of 1 mmol min⁻¹ of tetraguayacol).

Phenylalanine ammonia-lyase EC 4.3.1.5 (PAL)

The PAL was extracted with the method described by Martínez-Tellez and LaFuente (1997). Acetone powder (0.1 g) was mixed with 5 mL of cold sodium borate 0.1 M (pH 8.8) with 20 mM b-mercaptoethanol, in the tissue homogenizer during 50 s. The mixture was agitated for 20 min in an ice bath (4°C), then was filtered with cloth mesh and centrifuged at 12 500 rpm at 4 °C during 20 min. The supernatant was extracted, the enzyme was precipitated adding 0.46 g of ammonia sulphate per mL of supernatant and was agitated 30 min at 4 °C. It was centrifuged 20 min at 12 500 rpm and 4 °C; the precipitate was conserved and the supernatant was eliminated. The precipitate was re-dissolved adding 5 mL of sodium borate 0.1 M (pH 8.8), and this final extract was used for the enzymatic assay

sobrenadante y se agitó 30 min a 4 °C. Se centrifugó 20 min a 12 500 rpm y 4 °C; se conservó el precipitado y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se redisolvió agregando 5 mL de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8), y este extracto final se usó para el ensayo enzimático (Arz y Grambow, 1995). La mezcla tenía 1.8 mL de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) y 0.9 mL del extracto final, preincubado a 40 °C por 5 min; se agregó 0.3 mL de L-fenilalanina 100 mM y se midió la absorbancia a 290 nm. Simultáneamente se hizo el ensayo de una repetición de la muestra con 2.1 mL de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) y 0.9 mL del extracto final. Se evaluó el cambio de absorbancia en 2 h a 290 nm, manteniendo la muestra en baño maría a 40 °C. La actividad enzimática se reportó como Ug de peso fresco donde $U = \Delta$ (absorbancia) a 290 nm h^{-1} .

Los resultados de todas las variables se analizaron con los programas SAS, Sigma Plot 2000 y Excel. Además, para no enfocarse sólo en las respuestas aisladas de los compuestos analizados, sino detectar comportamientos paralelos o de interacción entre las variables estudiadas, se calcularon sus correlaciones con el método de máxima verosimilitud. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Progreso de la enfermedad

Sin fungicidas, la variedad susceptible Alpha murió por el ataque del tizón cuatro semanas después de la emergencia de los tallos, y fue seguida en susceptibilidad por la variedad medianamente resistente Zafiro, que incrementó su infección foliar de 10 a 80% en seis semanas. Los clones, resistentes, en ausencia de protección química no superaron 23% de ataque durante el mismo período (Figura 1,A). Con fungicidas, tanto Zafiro como los clones presentaron valores finales menores a 10% de infección, como resultado de la combinación de los fungicidas sobre el patógeno y de la resistencia genética de los hospedantes. Alpha, por el contrario, con fungicidas y 40% de infección foliar final, evidenció deficiencia del control químico (Figura 1,B). Lozoya-Saldaña y Hernández-Vilchis (2001) y Rubio *et al* (2001) observaron comportamientos similares. Cabe aclarar que durante el ciclo del cultivo se presentaron todas las razas patogénicas identificables del patógeno, a juzgar por su incidencia en plantas diferenciales que por rutina se establecen en el campo cada año (datos no incluidos).

Síntesis de fenoles totales

En ausencia de fungicidas, la variedad susceptible Alpha empezó el ciclo con cantidades casi imperceptibles de fenoles, inferiores a las de los genotipos resistentes, mientras que Zafiro, con cantidades iniciales similares a las de los clones, fue la variedad con

(Arz and Grambow, 1995). The mixture had 1.8 mL of sodium borate 0.1 M (pH 8.8) and 0.9 mL of the final extract, pre-incubated at 40 °C for 5 min; 0.3 mL of L-phenylalanine 100 mM was added and the absorbance was measured at 290 nm. Simultaneously, the assay of a replicate of the sample was carried out with 2.1 mL of sodium borate 0.1 M (pH 8.8) and 0.9 mL of the final extract. The change of absorbance was evaluated in 2 h at 290 nm, keeping the sample in a water bath at 40 °C. The enzymatic activity was reported as Ug of fresh weight where $U = \Delta$ (absorbance) at 290 nm h^{-1} .

The results of all of the variables were analyzed with the programs SAS, Sigma Plot 2000 and Excel. In addition, to focus not only on the isolated responses of the compounds analyzed, but rather to

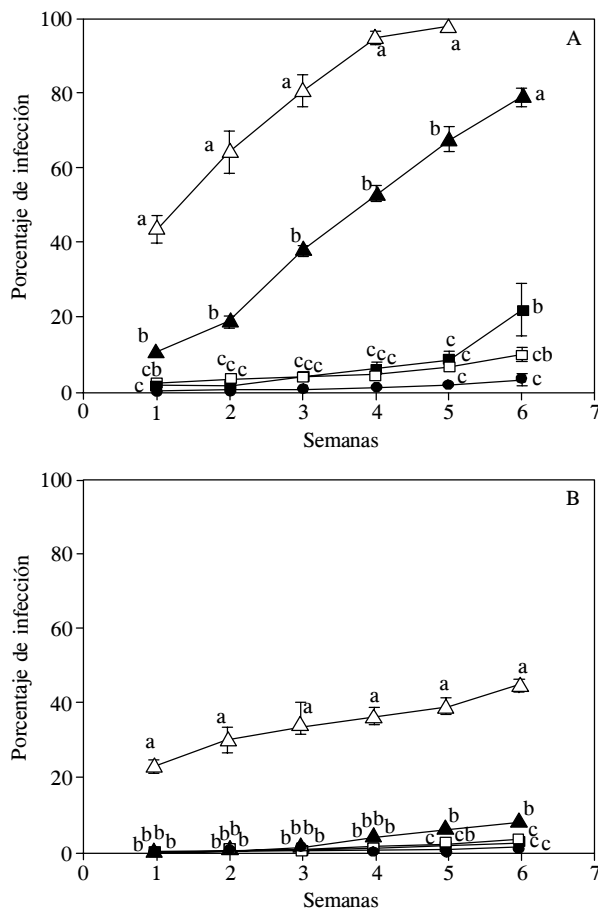


Figura 1. Porcentaje de infección en clones y variedades de papa sin (A) y con (B) fungicidas: △ Alpha; ▲ Zafiro; ■ Clon A00531-21; ● Clon A00502-3; □ Clon A00499-5. Medias con letras diferentes dentro de cada muestreo son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre genotipos en una misma fecha. Cada punto representa la media de cuatro observaciones \pm error estándar.

Figure 1. Percentage of infection in clones and varieties of potato with (A) and without (B) fungicides: △ Alpha; ▲ Zafiro; ■ Clone A00531-21; ● Clone A00502-3; □ Clone A00499-5. Means with different letters within each sampling are statistically different ($p \leq 0.05$) among genotypes on the same date. Each point represents the mean of four observations \pm standard error.

mayor cantidad y diferente estadísticamente ($p \leq 0.05$) del resto en las fases intermedias de desarrollo de la planta, aunque disminuyó al final para terminar con contenidos similares a los de los clones (Figura 2, A). Alpha ya no tenía follaje en el último muestreo, por lo que no hubo datos para tal fecha (Figura 2, A, C, y E). En el lote con fungicidas se detectaron cantidades relativamente bajas de fenoles al principio del ciclo para todos los genotipos, independientemente de su grado de resistencia genética al tizón. Luego hubo incrementos diferenciales, sobresaliendo la variedad susceptible Alpha, seguida de la resistente Zafiro. Al final, nuevamente las cantidades de fenoles fueron similares entre genotipos, lo que implicó reducción de los contenidos en las variedades mencionadas e incremento continuo en los clones (Figura 2, B). Los genotipos resistentes (Zafiro y los clones) tuvieron cantidades similares de fenoles en los lotes con y sin fungicidas; pero Alpha sintetizó menos al crecer sin fungicidas, coincidente con alta infección, que con protección química (Figura 2 A, B). La fenolización fue mayor en Alpha (susceptible) y Zafiro (medianamente resistente) en las fases intermedias del ciclo de crecimiento. Luego disminuyó, lo que junto con un bajo contenido inicial y ascenso posterior en los clones resistentes, indica que el desempeño de los compuestos fenólicos en la resistencia estriba en su presencia cuantitativa y en su dinámica de síntesis que disminuye o aumenta al final del ciclo en función de la susceptibilidad o resistencia del hospedante. Los reportes sobre la relación directa de mayores concentraciones de compuestos fenólicos en plantas resistentes que en las susceptibles, a veces no precisan esta dinámica (Velazhahan y Vidhyasekaran, 1994; Arora y Wagle, 1985; Bashan, 1986), lo mismo que cuando se observa estímulo de síntesis en presencia de agroquímicos (Cahill y Ward, 1989; Dercks y Creasy, 1989), como fue el caso de Alpha y Zafiro en este estudio.

Actividad de POX

Hubo baja actividad de esta enzima al inicio del ciclo en todos los materiales sin fungicidas, aumentando considerablemente en Alpha y Zafiro en las siguientes dos semanas, pero también declinó en Alpha al avanzar la infección. Esta disminución también se observó en Zafiro dos semanas después que en Alpha. Pero los clones tuvieron un ligero y continuo ascenso durante el ciclo, por lo que al final no hubo diferencia estadística ($p > 0.05$) entre genotipos (Figura 2, C). Este comportamiento, aunque con cifras diferentes, también se observó en el lote con fungicidas, donde al inicio la actividad de POX en los clones fue menor a las variedades, pero los primeros mantuvieron un ascenso

detect parallel behaviour or of interaction among the variables studied, their correlations were calculated with the maximum likelihood method. The means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Progress of the disease

Without fungicides, the susceptible variety Alpha died from the attack of late blight four weeks after the emergence of the stems, and was followed in susceptibility by the moderately resistant variety Zafiro, which increased the foliar infection from 10 to 80% in six weeks. The clones, resistant, in absence of chemical protection were no more than 23% infected during the same period (Figure 1, A). With fungicides, both Zafiro and the clones presented final values below 10% of infection, as a result of the combination of the fungicides over the pathogen and of the genetic resistance of the hosts. Alpha, on the other hand, with fungicides and 40% of foliar infection, showed deficiency of the chemical control (Figure 1, B). Lozoya-Saldaña and Hernández-Vilchis (2001) and Rubio *et al.* (2001) observed similar behaviour. It should be pointed out that during the crop cycle, all of the identifiable pathogenic races of the pathogen showed up, due to their incidence in differential plants which are routinely established in the field each year (data not included).

Synthesis of total phenols

In absence of fungicides, the susceptible variety Alpha began the cycle with almost imperceptible amounts of phenols, lower than those of the resistant genotypes, whereas Zafiro, with initial amounts similar to those of the clones, was the variety with greatest amount and statistically different ($p \leq 0.05$) from the rest in the intermediate phases of development of the plant, although it decreased at the final phase, ending with contents similar to those of the clones (Figure 2, A). Alpha no longer had foliage in the final sampling, therefore there were no data for this date (Figure 2, A, C, and E). In the plot with fungicides, relatively low amounts of phenols were detected at the beginning of each cycle for all of the genotypes, regardless of their degree of genetic resistance to the blight. Later there were differential increases, the susceptible Alpha variety being outstanding, followed by the resistant Zafiro variety. At the end, once again the amounts of phenols were similar among genotypes, which implied the reduction of the contents in the varieties mentioned and a continuous increase in the clones (Figure 2, B). The resistant genotypes (Zafiro and the clones) had similar amounts of phenols in the plots with and without

constante, mientras que las variedades declinaron (Figura 2, D). Ésto concuerda con reportes de aumentos tempranos en la actividad de POX en líneas resistentes

fungicidas. But Alpha synthesized less when it was grown without fungicides, coinciding with a high level of infection, than with chemical protection (Figure 2

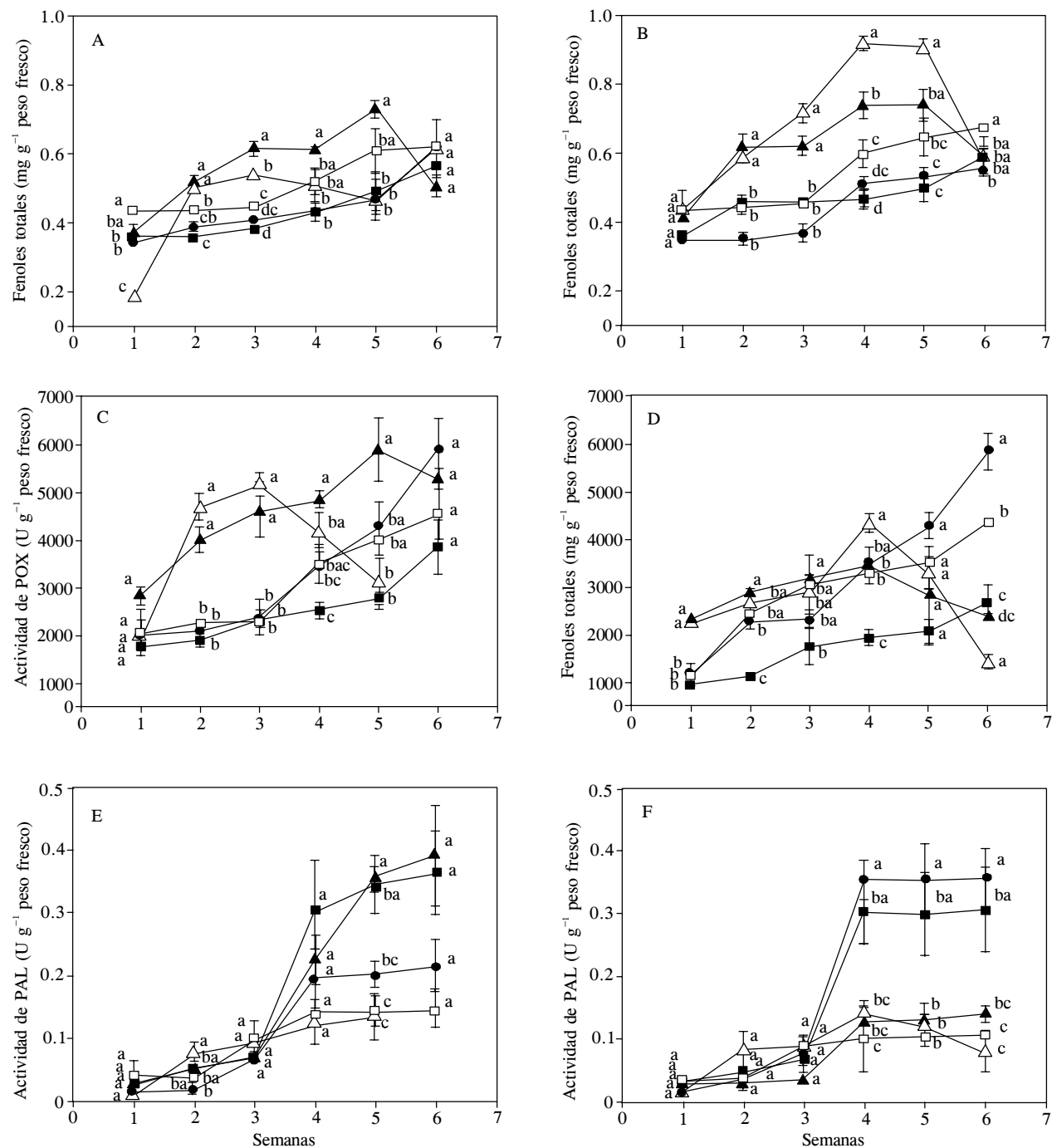


Figura 2. Concentración de fenoles totales (A, B), actividad de POX (C, D) y PAL (E, F). Sin fungicidas, A, C, E; con fungicida, B, D, F; △ Alpha; ▲ Zafiro; ■ A00531-21; ● A00502-3; □ A00499-5. Medias con letras diferentes dentro de cada muestreo son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Cada punto representa la media de cuatro observaciones \pm error estándar.

Figure 2. Concentration of total phenols (A, B), activity of POX (C, D) and PAL (E, F). Without fungicides, A, C, E; with fungicide, B, D, F; △ Alpha; ▲ Zafiro; ■ A00531-21; ● A00502-3; □ A00499-5. Means with different letters within each sampling are statistically different ($p \leq 0.05$). Each point represents the mean of four observations \pm standard error.

a enfermedades en Chile (*Capsicum annum* L.), así como en jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) ante el ataque de nematodos (Mozzetti *et al.*, 1995; Zacheo *et al.*, 1995). También se ha observado más actividad de POX en ausencia de fungicidas (Boller, 1982).

Actividad de PAL

Se detectó poca actividad de la PAL en las primeras tres semanas del estudio en todos los genotipos, independientemente de la aplicación o no de fungicidas. Luego se disparó su acción en cv. Zafiro y en el clon A00531-21 en el lote sin fungicidas, aunque sin diferencias estadísticas (Figura 2, E). El mismo comportamiento se vio en los clones A00502-3 y A00531-21 en el lote con fungicidas (Figura 2, F). La menor actividad se detectó en la variedad susceptible Alpha, que no completó su ciclo sin fungicidas. La PAL es un precursor de compuestos fenólicos, por lo que se espera su síntesis en hospedantes resistentes al ataque de patógenos, o selectivamente en presencia de agroquímicos (Mozzetti *et al.*, 1995; Cahill y Ward, 1989; Winkel-Shirley, 1999). Ésto se constata al comparar las gráficas A con la E y B con la F de la Figura 2, donde se observa un incremento continuo de fenoles en los clones resistentes, paralelo al incremento de la actividad de PAL en dos de ellos, y un decremento de fenoles y discreta acción de PAL al final del ciclo en la variedad Alpha y en Zafiro.

Cultivar Alpha

Las correlaciones fueron positivas y significativas ($p \leq 0.05$) en el lote sin fungicidas para las combinaciones Infección-PAL ($r=0.99$) y FEN-POX ($r=0.90$), lo que indica paralelismo en sus dinámicas de síntesis o acción química con la infección, propias de las variedades resistentes. Pero en el primer caso (infección-PAL) la actividad de la PAL, aunque paralela a la infección (Figura 1, A), fue muy limitada (Figura 2, B). La alta correlación FEN-POX se da porque en ambas variables las curvas son muy similares, de ascenso inmediato pero descenso posterior, propias de la susceptibilidad (Figura 2, A y C), lo cual concuerda con Dixon y Harrison (1991), Manibhushanrao *et al.* (1988) y Goodman, *et al.* (1986). La correlación entre la infección y la presencia de fenoles fue $r=0.75$, sin significancia estadística, lo cual refleja que el grado de avance de la enfermedad no fue acompañado con la misma intensidad en la acumulación de estos compuestos en este genotipo susceptible sin fungicidas. Se ha reportado mayor presencia de fenoles en plantas resistentes que en susceptibles (Arora y Wagle, 1985; Patil *et al.*, 1985; Bashan, 1986). Con fungicidas hubo

A, B). Phenolization was higher in Alpha (susceptible) and Zafiro (moderately resistant) in the intermediate phases of the growth cycle. Later it decreased, which together with the initial low initial content and a later increase in the resistant clones indicate that the performance of the phenolic compounds in resistance resides in their quantitative presence and also in their dynamic of synthesis which decreases or increases at the end of the cycle as a function of the susceptibility or resistance of the host. The reports of the direct relationship of higher concentrations of phenolic compounds in resistant plants than in the susceptible ones, sometimes do not specify this dynamic (Velazhahan and Vidhyasekaran, 1994; Arora and Wagle, 1985; Bashan, 1986), the same as when stimulus of synthesis is observed in the presence of agrochemicals (Cahill and Ward, 1989; Dercks and Creasy, 1989), as was the case of Alpha and Zafiro in the present study.

Activity of POX

There was low activity of this enzyme at the start of the cycle in all of the materials without fungicides, increasing considerably in Alpha and Zafiro in the following two weeks, but also decreased in Alpha as the infection advanced. This decrease was also observed in Zafiro two weeks later than in Alpha. The clones had a slight but continuous increase throughout the cycle, thus at the end there was no statistical difference ($p > 0.05$) among genotypes (Figure 2, C). This behaviour, although with different figures, was also observed in the plot with fungicides, where at the beginning the activity of POX in the clones was lower than the varieties, but the former maintained a constant increase, whereas the varieties decreased (Figure 2, D). This concurs with reports of early increases in the activity of POX in lines that are resistant to diseases in pepper, as well as in tomato under the attack of nematodes (Mozzetti *et al.*, 1995; Zacheo *et al.*, 1995). More activity of POX has also been observed in absence of fungicides (Boller, 1982).

Activity of PAL

Little activity of PAL was detected in the first three weeks of the study, in all of the genotypes, regardless of whether or not fungicides were applied. Later their action increased suddenly in cv. Zafiro and in the clone A00531-21 in the plot without fungicides, although without statistical differences (Figure 2, E). The same behaviour was seen in the clones A00502-3 and A00531-21 in the plot with fungicides (Figure 2, F). The lowest activity was detected in the susceptible cultivar Alpha, which did not complete its cycle without fungicides.

significancia en la correlación FEN-POX y FEN-PAL ($r=0.81$ y $r=0.94$). En la primera (Figura 2 B, C), al igual que en los lotes sin fungicidas, las curvas son parecidas, de ascenso inmediato pero disminución al final. En la segunda (FEN-PAL, Figura 2, B, F), aunque con formas de curvas parecidas, hay disminución al final y además muy poca actividad relativa de la PAL; si se considera que esta última está ligada a la síntesis de fitoalexinas (Goodman, *et al.*, 1986), las curvas y correlaciones obtenidas reflejan la susceptibilidad. En los tratamientos con protección química no hubo correlación significativa de la infección con las sustancias estudiadas, es decir, el avance limitado de la infección (Figura 1, B) no correspondió con las respuestas de síntesis (Figura 2, B, D, F). El factor fungicidas contrarrestó o disminuyó dicha respuesta de defensa en el hospedante susceptible en relación con la limitada infección (Cuadro 1).

Cultivar Zafiro

Sin fungicidas, hubo correlación positiva y estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), de la infección con POX y PAL, así como de FEN con POX y de POX con PAL (Cuadro 1, comparación de la Figura 1, B, con la Figura 2, B, D, F). Esta respuesta paralela y simultánea múltiple se interpreta como resistencia multigenética de este hospedante contra el patógeno (Niederhauser, 1962), es decir, no es una respuesta aislada o específica propia de la resistencia monogénica o vertical (Robinson, 1996). Pero la respuesta, y por ende la resistencia, fue incompleta pues el contenido de fenoles no correspondió a la infección ($r=0.58$), lo que explicaría el aumento de la enfermedad al final del ciclo en los tratamientos sin fungicidas (Figura 1, A). Zafiro es una variedad medianamente resistente al tizón, y en presencia de protección química tuvo correlaciones limitadas sólo de la infección con PAL ($r=0.93$). Al igual que con Alpha, los fungicidas alteraron la acción y presencia de las sustancias, sin relación entre ni entre ellas y la infección (Cuadro 1).

Clones

Los tres clones incluidos en este estudio, resistentes al tizón, sin y con protección con fungicidas, presentaron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre la mayoría de las combinaciones de las variables. Los ligeros aumentos en la infección (Figura 1) correspondieron a los aumentos de síntesis y actividad de las variables químicas (Figura 2). Presentaron un mejor equilibrio en el rápido establecimiento de los mecanismos de defensa contra *P. infestans* (Cuadro 1). Esto concuerda con Velazhahan y Vidhyasekaran

PAL is a precursor of phenolic compounds, and thus it is expected the synthesis of these compounds in hosts that are resistant to the attack of pathogens, or selectively in the presence of agrochemicals (Mozzetti *et al.*, 1995; Cahill and Ward, 1989; Winkel-Shirley, 1999). This is confirmed when comparing graphs A with E and B with F of Figure 2, where a continuous increase of phenols is observed in the resistant clones, parallel to the increase in the activity of PAL in two of them, and a decrease of phenols and discrete action of PAL at the end of the cycle in Alpha and Zafiro.

Alpha cultivar

The correlations were positive and significant ($p \leq 0.05$) in the plot without fungicides for the combinations Infection-PAL ($r=0.99$) and FEN-POX ($r=0.90$), which indicates parallelism in their dynamics of synthesis or chemical action with the infection, common to the resistant varieties. But in the first case (infection-PAL), the activity of PAL, although parallel to the infection (Figure 2, A), was very limited (Figure 2, B). The high correlation FEN-POX occurs because in both variables the curves are very similar, of immediate ascent followed by later descent, common to the susceptibility (Figure 2, A and C), which concurs with Dixon and Harrison (1991), Manibhushanrao *et al.* (1988) and Goodman *et al.* (1986). The correlation between the infection and the presence of phenols was $r=0.75$, without statistical significance, which reflects that the degree of advance of the disease was not accompanied by the same intensity in the accumulation of these compounds in this susceptible genotype without fungicides. A greater presence of phenols has been reported in resistant plants than in susceptible ones (Arora and Wagle, 1985; Patil *et al.*, 1985; Bashan, 1986). With fungicides, there was significance in the correlation FEN-POX and FEN-PAL ($r=0.81$ and $r=0.94$). In the first (Figure 2 B, C), as in the plots without fungicides, the curves are similar, of immediate ascent but with descent at the end. In the second (FEN-PAL, Figure 2, B, F), although with similar forms of curves, there is decrease at the end and also very little relative activity of PAL; if it is considered that the latter is linked to the synthesis of phytoalexins (Goodman *et al.*, 1986), the curves and correlations obtained reflect the susceptibility. In the treatments with chemical protection, there was no significant correlation of the infection with the substances studied, that is, the limited advance of the infection (Figure 1, B) did not correspond to the responses of synthesis (Figure 2, B, D, F). The fungicides factor counteracted or reduced this defense response in the susceptible host with respect to the limited infection (Table 1).

Cuadro 1. Correlación entre variables de los genotipos sin (S/F) y con fungicida (C/F).**Table 1. Correlation among variables of the genotypes without (S/F) and with fungicide (C/F).**

	Variables	Fenoles	POX	PAL
Alpha S/F	% Infección	0.75 ^{ns}	0.41 ^{ns}	0.98*
	Fenoles		0.90*	0.80 ^{ns}
	POX			0.46 ^{ns}
Alpha C/F	% Infección	0.49 ^{ns}	-0.05 ^{ns}	0.63 ^{ns}
	Fenoles		0.81*	0.94*
	POX			0.71 ^{ns}
Zafiro S/F	% Infección	0.58 ^{ns}	0.91*	0.96*
	Fenoles		0.85*	0.50 ^{ns}
	POX			0.86*
Zafiro C/F	% Infección	0.48 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	0.93*
	Fenoles		0.72 ^{ns}	0.63 ^{ns}
	POX			0.08 ^{ns}
A00531-21 S/F	% Infección	0.96*	0.98*	0.77 ^{ns}
	Fenoles		0.97*	0.91*
	POX			0.84*
A00531-21 C/F	% Infección	0.94*	0.97*	0.86*
	Fenoles		0.91*	0.73 ^{ns}
	POX			0.86*
A00502-3 S/F	% Infección	0.99*	0.99*	0.81 ^{ns}
	Fenoles		0.9670*	0.79 ^{ns}
	POX			0.88*
A00502-3 C/F	% Infección	0.94*	0.98*	0.91*
	Fenoles		0.92*	0.99*
	POX			0.87*
A00499-5 S/F	% Infección	0.93*	0.95*	0.80 ^{ns}
	Fenoles		0.98*	0.86*
	POX			0.89*
A00499-5 C/F	% Infección	0.93*	0.90*	0.82*
	Fenoles		0.82*	0.83*
	POX			0.89*

* Nivel de significancia $p \leq 0.05$; POX: peroxidasa; PAL: fenilalanina amonio-liasa; ns: no significativo.

(1994), Bashan (1986), Luthra *et al.* (1988) y Mucharromah *et al.* (1995).

Consideraciones generales

Hasta donde se tiene conocimiento, este reporte sería uno de los primeros establecidos en el lugar de origen de la interacción *P. infestans*-papa (Goodwin, 1996). Se muestra que la cuantificación final de los metabolitos estudiados no es suficiente y hay que dar seguimiento en síntesis inicial, acción y sobre todo permanencia. Por ejemplo el cultivar susceptible, Alpha, tuvo respuestas de resistencia al inicio del ciclo, y se considera

Zafiro cultivar

Without fungicides, there was positive and statistically significant correlation ($p \leq 0.05$) of the infection with POX and PAL, as well as FEN with POX and of POX with PAL (Table 1, comparison of Figure 1, B, with Figure 2, B, D, F). This parallel and simultaneous multiple response is interpreted as multigenetic resistance of this host against the pathogen (Niederhauser, 1962), that is, it is not an isolated or specific response typical to the monogenic or vertical resistance (Robinson, 1996). But the response, and finally the resistance, was incomplete because the content of phenols did not correspond to the infection ($r=0.58$), which would explain the increase of the disease at the end of the cycle in the treatments without fungicides (Figure 1, A). Zafiro is a variety that is moderately resistant to late blight, and in the presence of chemical protection had limited correlations only of the infection with PAL ($r=0.93$). As with Alpha, the fungicides altered the action and presence of the substances, without relationship among each other nor with the infection (Table 1).

Clones

The three clones included in this study, resistant to blight, with and without protection with fungicides, presented statistically significant positive correlations among most of the combinations of the variables. The slight increases in the infection (Figure 1) corresponded to the increases of synthesis and activity of the chemical variables (Figure 2). They presented a better balance in the rapid establishment of the mechanisms of defense against *P. infestans* (Table 1). This agrees with Velazhahan and Vidhyasekaran (1994), Luthra *et al.* (1988) and Mucharromah *et al.* (1995).

General considerations

As far as we know, this report would be one of the first established in the place of origin of the interaction *P. infestans*-potato, (Goodwin, 1996). It is shown that the final quantification of the metabolites studied does not suffice and it is necessary to follow up on initial synthesis, action, and, above all, permanence. For example, the susceptible Alpha cultivar susceptible, had responses of resistance early in the cycle and it is considered resistant in Europe and the US; but its susceptibility resided in the decrease of the compounds during the second half of the crop cycle, added to the natural increase in the amount and pathogenic diversification of the inoculum (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2005). Some genotypes conserved their resistance due

resistente en Europa y EE.UU., pero su susceptibilidad radicó en la disminución de los compuestos durante la segunda mitad del ciclo de cultivo, aunado al incremento natural en cantidad y diversificación patogénica del inóculo (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2005). Algunos genotipos conservaron su resistencia debido a que aumentaron su actividad enzimática al final (POX y PAL). Los clones resistentes que no presentaron estos incrementos posiblemente basen su resistencia en otros compuestos, mecanismos, acciones o señales no incluidas en este trabajo (lipoxigenasas, superóxido dismutasas, ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno, fosfolipasas, resistencia sistémica adquirida, hipersensibilidad, etc.). La multigenicidad de la resistencia o resistencia horizontal atribuida a los clones se basa en: a) los hospedantes no se infectaron con las múltiples variantes patogénicas de *P. infestans* que regularmente se presentan al final del ciclo (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2005); b) algunos metabolitos, como la PAL, están regulados por uno o más genes (Buchanan *et al.*, 2000). Además la resistencia mostrada por los genotipos en este trabajo se respaldó con la acción de los otros metabolitos estudiados, es decir, se activaron varios genes.

CONCLUSIONES

Hubo respuesta diferencial en la actividad enzimática de defensa entre genotipos. No se observó la relación inversa esperada en la concentración de fenoles respecto a la infección (a mayor presencia de fenoles se esperaba menor infección), pero sí se observó en la actividad de POX y PAL; por tanto, los fenoles no fueron factor discriminatorio de resistencia-susceptibilidad. Los fungicidas indujeron reacciones de defensa en menor intensidad en las plantas tratadas. Hubo variación en la correlación entre variables de acuerdo con el grado de resistencia de los genotipos, siendo el susceptible el que tuvo menores correlaciones que los resistentes. La resistencia fue el resultado de un mayor o mejor equilibrio entre variables y de la permanencia de la actividad metabólica de los compuestos estudiados. La limitada infección final de los clones, acompañada de la síntesis de las diversas sustancias de defensa, sugiere el carácter poligénico o de resistencia horizontal en esos genotipos.

LITERATURA CITADA

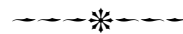
Alia-Tejacal, I., M. T. Martínez-Damián, y M. R. Soto-Hernández. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H. E. Moore & Stearn) durante poscosecha. Revista Chapingo. Serie Horticultura 8:263-271.

to the fact that they increased their enzymatic activity at the end (POX and PAL). The resistant clones that did not present these increases possibly base their resistance on other compounds, mechanisms, actions or signals that are not included in this study (lipoxigenases, superoxide dismutases, jasmonic acid, salicylic acid, ethylene, phospholypases, acquired systemic resistance, hypersensitivity, etc.). The multigenicity of the resistance or horizontal resistance that is attributed to the clones, is based on: a) the hosts did not become infected with the multiple pathogenic races of *P. infestans* that regularly appear at the end of the cycle (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2005); b) some metabolites, such as PAL, are regulated by one or more genes (Buchanan *et al.*, 2000). Besides the resistance shown by the genotypes in this study was supported by the action of the other metabolites studied; that is, various genes had to be activated.

CONCLUSIONS

There was differential response in the enzymatic activity of defense among genotypes. The expected inverse relationship was not observed in the concentration of phenols with respect to the infection (it was expected that the higher the presence of phenols, the lower the infection would be), but it was observed in the activity of POX and PAL; therefore, the phenols were not a discriminatory factor of resistance-susceptibility. The fungicides induced reactions of defense in a lower intensity in the treated plants. There was variation in the correlation among variables according to the degree of resistance of the genotypes, the susceptible genotype having fewer correlations than the resistant ones. The resistance was the result of a greater or better equilibrium among variables and of the permanence of the metabolic activity of the compounds studied. The limited final infection of the clones and the synthesis of the diverse substances of defense, suggests the polygenic character or of horizontal resistance in these genotypes.

—End of the English version—



Andreu, A., C. Oliva, S. Distel, and G. Daleo. 2000. Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. Potato Res. 44:1-9.

Arora, K., and D. S. Wagle. 1985. Interrelationship between peroxidase, polyphenol oxidase activities and phenolic content of wheat for resistance to loose smut. Biochem. Physiol. Pflanzen. 180:75-80.

- Arz, C. M., and J. H. Grambow. 1995. Elicitor and suppressor effects on phospholipase C in isolated plasma membranes correlate with alterations in phenylalanine ammonia-lyase activity of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 146: 64-70.
- Bashan, Y. 1986. Phenols in cotton seedlings resistant and susceptible to *Alternaria macrospora*. *Phytopathology.* 116: 11-17.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem, and R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. 1367 p.
- Boller T. 1982. Ethylene-induced biochemical defenses against pathogens. *In:* Wareing, P. F. (ed). *Plant Growth Substances.* Academic Press. London. pp: 303-312.
- Cahill, D. M., and E. W. B. Ward. 1989. Effects of metalaxyl on elicitor activity, stimulation and glyceollin production and growth of sensitive and tolerant isolates of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:97-112.
- Dercks, W., and L. Creasy. 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:203-213.
- Dixon, R. A., and M. J. Harrison. 1991. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Genet.* 28:166-234.
- Flurkey, W. H., and J. J. Jen. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.* 43:1828-1831.
- Fry, W.O., and S. B. Goodwin. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* 47: 363-371.
- Goodman, N. R., Z. Kiraly, and K. R. Wood. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease.* University of Missouri Press. Columbia, Missouri, U.S.A. 433 p.
- Goowdin, S. B. 1996. Origin and ecology of *Phytophthora infestans*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14: 143-147.
- Henfling, W. J. 1987. Late blight of potato (*Phytophthora infestans*). Technical information bulletin 4. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. 25 p.
- Lozoya-Saldaña H., y A. Hernández-Vilchis. 2001. Compuestos registrados y de la sección 18 para el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De By) en papa en Toluca, México. *Agrociencia* 35: 451-458.
- Lozoya-Saldaña, H., O. Barrios, and J. Bamberg. 2005. *Phytophthora infestans*; Races vs genotypes in the Toluca Valley, México. Potato Association of América 89th Annual Meeting, Calgary, Alberta, Canadá. Resumen G-40.
- Luthra, Y. P., S. K. Gandhi, U. N. Joshi, and S. K. Arora. 1988. Total phenols and their oxidative enzymes in sorghum leaves resistant and susceptible to *Ramulispora sorghicola* Harris. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 23: 393-399.
- Manibhushanrao, K., Z. Mohammed, and N. Matsuyama. 1988. Phenol metabolism and plant disease resistance. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 23: 103-114.
- Martínez-Téllez, M. A., and M. T. Lafuente. 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150: 674-678.
- Mozzetti, C., L. Ferraris, G. Tamiotti, and A. Matta. 1995. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:95-107.
- Mucharromah, H. R. Burton, and J. Kuae. 1995. The effect of sterols on phytoalexin, steroid glycoalkaloid, and sterol accumulation in potato tuber discs inoculated with *Phytophthora infestans* or treated with arachidonic acid. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47: 13-27.
- Niederhauser, J. S. 1962. Evaluation of multigenic "field resistance" of the potato to *Phytophthora infestans* in 10 years of trials at Toluca, México. *Phytopathology* 52: 746 (abstract).
- Patil, S. H., R. K. Hedge and K. H. Anahosur. 1985. Role of sugars and phenols in charcoal rot resistance of sorghum. *Phytopathology. Z.* 113: 30-35.
- Robinson, D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. *In:* Fox P. F. (ed). *Food Enzymology.* Vol. 1. Elsevier, London. pp: 399-426.
- Robinson, R. A. 1996. *Return to Resistance. Breeding Crops to Reduce Pesticide Dependence.* Agaches, Davis, CA, USA. 480 p.
- Rubio C., O., V. Magallanes, C. Díaz, A. Rivera, H. López, y T. Zavala. 2001. Zafiro y Malinche: nuevas variedades de papa mexicanas. *In:* Fernández-Northcote, E. N. (ed). *Memorias del Taller Internacional Complementando la resistencia al tizón (Phytophthora infestans) en los Andes.* Cochabamba, Bolivia. pp: 3.
- Trujillo, A., O. Navia, J. Gabriel, A. Gandarillas, y E. N. Fernández-Northcote. 2001. Utilización de un activador de resistencia en estrategias de control químico del tizón de la papa (*Phytophthora infestans*) en un cultivar resistente. *In:* Fernández-Northcote E. N. (ed). *Memorias del Taller Internacional: Complementando la Resistencia al Tizón (Phytophthora infestans) en los Andes.* Cochabamba, Bolivia. pp: 5.
- Velazhahan, R., and P. Vidhyasekaran. 1994. Role of phenolic compounds, peroxidase and polyphenol oxidase in resistance of groundnut to rust. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 29: 23-29.
- Waterman, P. G., and S. Mole. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites.* Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- Winkel-Shirley, B. 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Pl.* 107: 142-149.
- Zacheo G., T. Blevé-Zacheo, D. Pacoda, C. Orlando, and R. D. Durbin. 1995. The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:491-507.