

Sensitivity to fungicides of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo, Mexico

Sensibilidad a fungicidas del *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en Chapingo, México

Héctor Lozoya-Saldaña^{1*}; Martha Nayeli Robledo-Esqueda²; Patricia Rivas-Valencia³; Sergio Sandoval-Islas²; María Teresa Beryl Colinas y León¹; Cristian Nava-Díaz²

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Textcoco km 38.5, Chapingo, México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Colegio de Posgraduados, Instituto de Fitosanidad. Carretera México-Textcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, MÉXICO.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Agrícola Experimental Valle de México. Carretera Los Reyes-Textcoco km 13.5, Coatlinchán, Texcoco, C. P. 56250, MÉXICO.

*Corresponding author: picti87@gmail.com, phone (595) 952-1500 ext. 5224.

Abstract

Chemical control of plant diseases exerts high selection pressure for the development of pathogen resistance to fungicides. The objectives of this study were to quantify the existence of late blight in *Solanum tuberosum* L., detect the presence of variants of the oomycete resistant to agrochemicals and compare the different levels of resistance in the isolates from one cycle to another. Plots of the potato cv. Fianna, susceptible to late blight (*Phytophthora infestans* [Mont.] de Bary), were exposed to natural infection of the pathogen to detect the presence of variants of the oomycete resistant to the agrochemicals from one cycle to another, and from *in vivo* with respect to *in vitro* conditions, by applying a half dose of fungicides. The disease reached 100 % final foliar infection in treatments with ciazofamid in 2011 and with fosetyl-Al in 2012. On the other hand, mandipropamid allowed only 21-22 % infection in both years in the field. However, 49 % of the *P. infestans* population was susceptible, 39 % was intermediate, and 19 % was resistant to this product *in vitro*. Plots treated with fosetyl-Al reached 80-100 % infection in the field, while *in vitro* 88 and 46 % of the *P. infestans* populations showed intermediate resistance when exposed to high dosages of the product, and 62 % were resistant at low dosage. Isolates from field plots with natural infection exposed to ciazofamid were all sensitive *in vitro*. The inconsistencies of the oomycete regarding fungicide resistance/sensitivity under *in vivo/in vitro* conditions, as well from one year to another, do not support behavior predictability. These results expose the great genetic plasticity of the oomycete in relation to its sensitivity to fungicides.

Keywords: late blight, potato, *Solanum tuberosum*, fungicide resistance.

Resumen

El control químico de las enfermedades de las plantas ejerce gran presión de selección en el desarrollo de resistencia del patógeno a fungicidas. Los objetivos del presente estudio fueron cuantificar la existencia de tizón tardío en *Solanum tuberosum* L., detectar la presencia de variantes del oomiceto resistentes a agroquímicos y comparar los diferentes niveles de resistencia en los aislados de un ciclo a otro. Se expusieron parcelas de papa var. Fianna, susceptibles al tizón tardío (*Phytophthora infestans* [Mont.] de Bary), a la infección natural del patógeno para detectar la presencia de variantes del oomiceto resistentes a agroquímicos de un ciclo a otro, y bajo condiciones *in vivo* respecto a *in vitro* mediante la aplicación de medias dosis de fungicidas. La enfermedad alcanzó 100 % de infección foliar final en tratamientos con ciazofamida en 2011 y con fosetil-Al en 2012. Por otro lado, la mandipropamida permitió solamente de 21 a 22 % de infección en ambos años en campo. No obstante, 49 % de la población de *P. infestans* resultó susceptible, 39 % intermedia y 19 % fue resistente a este producto *in vitro*. Las parcelas tratadas con fosetil-Al alcanzaron de 80 a 100 % de infección en campo y 88 % *in vitro*. El 46 % de las poblaciones de *P. infestans* mostraron resistencia intermedia cuando se expusieron a dosis altas del producto y 62 % fueron resistentes a dosis bajas. Los aislados de parcelas con infección natural expuestos a ciazofamida fueron sensibles *in vitro*. Las inconsistencias del oomiceto en relación a la resistencia/susceptibilidad a los fungicidas bajo condiciones *in vitro/in vivo*, así como de un año a otro, no explican la predictibilidad del comportamiento. Estos resultados exponen la gran plasticidad genética del oomiceto en relación con su sensibilidad a los fungicidas.

Palabras clave: tizón tardío, papa, *Solanum tuberosum*, resistencia a fungicidas.



Introduction

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary is the causal agent of late blight in potato (*Solanum tuberosum* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and other solanaceae. The oomycete infects the entire plant and disperses its sporangia rapidly by the wind if the conditions are right. If the crop is not protected with fungicides with different modes of action, resistance to some products could occur and the potato crops are destroyed in a matter of weeks (Abad & Ochoa, 1995; Díaz-de la Cruz, Lozoya-Saldaña, Sahagun-Castellanos, & Peña-Lomelí, 2014). Nevertheless, the best management measure has still been the use of fungicides, but the populations of *P. infestans* have developed resistance to these products, favored by the continuous application of a single fungicide (Damicone, 2004).

Considering the above, metalaxyl is such an important product that it is still in use. It acts on specific sites of the pathogen, preventing the biosynthesis of proteins through interference in the synthesis of ribosomal RNA, which can be overcome by naturally resistant variants of the pathogen. This fact was reported in 1981 in Europe, and in 1993 in the U.S., Canada, Mexico and Ecuador (Davidse, Looijen, Turkesnteen, & van der Wal, 1981; Drenth, Goodwin, Fry, & Davidse, 1993; Forbes et al., 1997; Matuszak, Fernández, Gu, Villarreal, & Fry, 1994; Marquinez, 1995; Power, Hamlen, & Morehart, 1995), to the point that this resistance is now considered an additional variable for characterizing *P. infestans* (Doster, Milgroom, & Fry, 1990; Dowley & O'Sullivan, 1985; Kato, Mizubuti, Goodwin, & Fry, 1997; Matuszak et al., 1994; Runno & Koppel, 2006).

Recently, other systemic substances have appeared on the market for the control of late blight, such as cyazofamid, which interferes with the mitochondrial respiration chain, and mandipropamid, which inhibits the synthesis of cellulose of the cell wall of the oomycete, acts on the protein PiCesA3 cellulose synthase, and is involved in the mycelium and haustoria formation during the initial incubation phase of the disease (Blum et al., 2010; Cohen et al., 2007). In addition, mandipropamid modifies the biosynthesis of the phospholipids and causes alterations in the F-actins (Griffiths, Dancer, O' Neill, & Harwood, 2003).

Another product, fosetyl-Al, acts on the plant by stimulating its defense mechanisms, increasing its levels of peroxidases, phytoalexins, polysaccharides and the activity of the phenylalanine ammonia lyase (Brent & Hollomon, 2007; Gisi & Cohen, 1996; Robledo-Esqueda, Lozoya-Saldaña, & Colinas-León, 2012; Serrano-Cervantes, Lozoya-Saldaña, Colinas y León, & Leyva-Mir, 2016). The mode of action of this product is based on its influence on enzymatic phosphorylation

Introducción

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary es el agente causal del tizón tardío en papa (*Solanum tuberosum* L.), en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y otras solanáceas. El oomiceto infecta a la planta completa y dispersa rápidamente sus esporangios mediante el viento si las condiciones son propicias. Si el cultivo no está protegido con fungicidas, con diferentes modos de acción, el patógeno podría generar resistencia a algunos productos y los cultivos de papa se destruirían en cuestión de semanas (Abad & Ochoa, 1995; Díaz-de la Cruz, Lozoya-Saldaña, Sahagun-Castellanos, & Peña-Lomelí, 2014). Actualmente, la mejor medida de control sigue siendo el uso de fungicidas; sin embargo, las poblaciones de *P. infestans* han desarrollado resistencia a estos productos, debida al uso continuo de un solo fungicida (Damicone, 2004).

Considerando lo anterior, el metalaxil es un producto tan importante que aún está en uso. Actúa en áreas específicas del patógeno impidiendo la biosíntesis de proteínas a través de la interferencia en la síntesis de ARN ribosómico; lo cual puede ser superado por variantes del patógeno naturalmente resistentes. Este hecho fue reportado en 1981 en Europa y en 1993 en Estados Unidos, Canadá, México y Ecuador (Davidse, Looijen, Turkesnteen, & van der Wal, 1981; Drenth, Goodwin, Fry, & Davidse, 1993; Forbes et al., 1997; Marquinez, 1995; Matuszak, Fernández, Gu, Villarreal, & Fry, 1994; Power, Hamlen, & Morehart, 1995), hasta el punto en que esta resistencia se considera una variable adicional para caracterizar a *P. infestans* (Doster, Milgroom, & Fry, 1990; Dowley & O'Sullivan, 1985; Kato, Mizubuti, Goodwin, & Fry, 1997; Matuszak et al., 1994; Runno & Koppel, 2006).

Recientemente, otras sustancias sistémicas han aparecido en el mercado para el control del tizón tardío, como la ciazofamida, que interfiere con la cadena respiratoria mitocondrial, y la mandipropamida, que inhibe la síntesis de celulosa de la pared celular del oomiceto, actúa sobre la proteína PiCesA3 celulosa sintetasa e interfiere en la formación de micelio y haustorios durante la fase inicial de incubación de la enfermedad (Blum et al., 2010; Cohen et al., 2007). Además, la mandipropamida modifica la biosíntesis de los fosfolípidos y provoca alteraciones en las F-actinas (Griffiths, Dancer, O' Neill, & Harwood, 2003).

Fosetil-Al es un fungicida que actúa sobre la planta estimulando sus mecanismos de defensa, aumentando sus niveles de peroxidasa, fitoalexinas, polisacáridos y la actividad de la fenilalanina amonio liasa (Brent & Hollomon, 2007; Gisi y Cohen, 1996; Robledo-Esqueda, Lozoya-Saldaña, & Colinas-León, 2012; Serrano-Cervantes, Lozoya-Saldaña, Colinas y León, & Leyva-Mir, 2016). El modo de acción de este producto se basa

and on the metabolism of the phosphorus, affecting the synthesis of different compounds that contain this element, essential for the growth of *Phytophthora*, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), adenosine triphosphate (ATP) and nucleotides (Gómez & Reis, 2011).

With respect to the pathogen, the heterothallic character of *P. infestans* confers evolutionary advantages, given that it increases the genetic variability and the exchange of virulence factors, thus on the population scale these recombination events generate more aggressive genotypes, adapting to various ecological niches and to the selection pressure by the fungicides (Adler et al., 2004; Erwin & Ribeiro, 1996; Goodwin, Sujkowski, & Fry, 1995; Knapova, Tenzer, Gessler, & Gisi, 2001). In Mexico, pathogen variability and resistance to metalaxyl have been reported in different agricultural regions (Garay-Serrano et al., 2007; Grünwald et al., 2006; Matuszak et al., 1994), particularly in Toluca Valley, state of Mexico, the center of origin of *P. infestans* (Grünwald et al., 2006; Grünwald & Flier, 2005).

With respect to the susceptibility of the fungicides, a new database was generated for a sexual population of the pathogen, with a wide range of sensitivity to metalaxyl, while for azoxistrobin, a chemical compound of the estrobilurine family, resistance was present (Evenhuis, Schepers, Bus, & Stegeman, 1996; Grünwald et al., 2001, 2006). These studies do not contemplate the area of Chapingo, Mexico, which is the second center of genetic diversification of the oomycete after Toluca (Goodwin, 1996), and it has the ideal climate for the development of the disease (Díaz de la Cruz et al., 2014), with wild populations of the oomycete (Alarcón-Rodríguez, Lozoya-Saldaña, Valadez-Moctezuma, García-Mateos, & Colinas-León, 2013).

Therefore, the objectives of the present study were to quantify the presence of late blight in the field in two growing cycles, detect the presence of variants of the oomycete resistant to agrochemicals, and compare the different levels of resistance in isolates from one cycle to another (*in vivo* first year vs *in vivo* second year) and *in vivo* with respect to *in vitro* in Chapingo, Mexico.

Materials and methods

Collection of isolates of *P. infestans* and infection readings

In the summer of 2011 and 2012, plots of potato cv. Fianna, susceptible to late blight, were established at the Autonomous University of Chapingo Experiment Station, located 25 km east of the Mexico City International Airport, at 2,250 masl with a C(Wo)(W) b(i)g climate, an average temperature of 15 °C and a

en su influencia sobre la fosforilación enzimática y el metabolismo del fósforo, afectando la síntesis de diferentes compuestos que contienen este elemento esencial para el crecimiento de *Phytophthora*, como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), trifosfato de adenosina (ATP) y nucleótidos (Gómez & Reis, 2011).

Respecto al patógeno, el carácter heterotálico de *P. infestans* le confiere ventajas evolutivas, dado que aumenta su variabilidad genética e intercambio de los factores de virulencia. Por ende, en la escala de población, estos eventos de recombinación generan genotipos más agresivos, adaptándose a diferentes nichos ecológicos y a la presión de selección ejercida por los fungicidas (Adler et al., 2004; Erwin & Ribeiro, 1996; Goodwin, Sujkowski, & Fry, 1995; Knapova, Tenzer, Gessler, & Gisi, 2001). En México, la variabilidad y la resistencia del patógeno al metalaxil han sido reportadas en diferentes regiones agrícolas (Garay-Serrano et al., 2007; Grünwald et al., 2006; Matuszak et al., 1994), particularmente en el Valle de Toluca, México, centro de origen de *P. infestans* (Grünwald et al., 2006; Grünwald & Flier, 2005).

Con respecto a la susceptibilidad de los fungicidas, se generó una nueva base de datos para una población sexual del patógeno, con una amplia gama de sensibilidad al metalaxil; en tanto que para la azoxistrobina, un compuesto químico de la familia de las estrobilurinas, la resistencia estaba presente (Evenhuis, Schepers, Bus, & Stegeman, 1996; Grünwald et al., 2001, 2006). Estos estudios no incluyen el área de Chapingo, México, que es el segundo centro de diversificación genética del oomiceto después de Toluca (Goodwin, 1996) y que tiene el clima ideal para el desarrollo de la enfermedad (Díaz de la Cruz et al., 2014), con poblaciones silvestres de oomicetos (Alarcón-Rodríguez, Lozoya-Saldaña, Valadez-Moctezuma, García-Mateos, & Colinas-León, 2013).

Por lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron cuantificar la existencia de tizón tardío en campo abierto en dos ciclos de cultivo, detectar la presencia de variantes del oomiceto resistentes a agroquímicos y comparar los diferentes niveles de resistencia en los aislados de un ciclo a otro (*in vivo* primer año vs *in vivo* segundo año) e *in vivo* con respecto a *in vitro* en Chapingo, México.

Materiales y métodos

Colecta de aislados de *P. infestans* y lecturas de la infección

En verano de 2011 y 2012 se establecieron parcelas de papa cv. Fianna susceptibles al tizón tardío en la Estación Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada a 25 km al este del Aeropuerto

reliable rainy season in the summer (645 mm). The experiment was conducting using a randomized block design with four rows of 4 m in length, with four replicates, under rainfed conditions and exposed to natural infection by the oomycete.

The treatments consisted of five weekly foliar sprayings of half dosages, according to the label, of metaxyl, fosetyl-Al, mandipropamid, propamocarb, cyazofamid, or water (absolute control) from 45 days after planting on. In order to get the disease progress curve, during the same period foliar infection readings were taken from ten individuals in the central rows per treatment, according to the Henfling scale (1987). The numbers of readings of the infection had a week of posterior offset with respect to the application of the products. Thus, the first reading corresponded to the second week of spraying, and the fifth reading was made a week after the fifth (and final) application of the products, that is, six weeks after the first spraying.

At the end of each cycle the comparison of means was made of the final reading, where the central rows were the useful plot. The area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated according to Campbell and Madden (1990) and Shaner and Finney (1977), using the formula:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

where the final value of AUDPC is the sum of the areas by lapses, which result from the multiplication of the average reading of two consecutive dates (y value) by the lapse (days, t value) between readings.

During the crop cycles samples of leaves and stems with simple lesions of blight were collected from each one of the treatments. They were subjected to moist chambers at room temperature (22-25 °C) with white light for 24 h to induce the formation of sporangia, and disinfested potato slices were added over the lesion. After 2 d, mycelial growth which permeated the slices was observed. Mycelial tips were removed using a dissection needle and then sown in rye agar medium (Alarcón-Rodríguez et al., 2013) with oxytetracycline, and incubated at a constant temperature (17 °C).

Identification of mating types

To determine mating type (A1, A2), “unknown” isolates were plated at one end of a Petri dish with rye agar medium. At the other end of the dish a reference isolate of a known type was sown (A1 or A2, kindly provided by Dr. Sylvia P. Fernández Pavía, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*) and maintained at a temperature of 17 °C in darkness. In one week the colonial growths were assessed for developing sexual

Internacional de la Ciudad de México, a 2,250 msnm con un clima C(Wo)(W)b(i)g, temperatura promedio de 15 °C y estación de lluvias fiable en verano (645 mm). El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro hileras de 4 m de longitud y cuatro repeticiones, bajo condiciones de temporal y expuestos a infección natural por el oomiceto.

Los tratamientos consistieron en cinco aspersiones foliares semanales de medias dosis, de acuerdo con las etiquetas de metaxil, fosetil-Al, mandipropamida, propamocarb, ciazofamida o agua (control absoluto) a partir de los 45 días después de la siembra. Con la finalidad de obtener la curva de desarrollo de la enfermedad, durante el mismo período se tomaron lecturas de infección foliar de diez individuos de las hileras centrales por tratamiento, conforme a la escala de Henfling (1987). El número de lecturas de la infección tuvo una semana de compensación posterior con respecto a la aplicación de los productos. Así, la primera lectura correspondió a la segunda semana de aspersión y la quinta lectura se hizo una semana después de la quinta (y final) aplicación de los productos, esto es, a la sexta semana.

Al final de cada ciclo se realizó la comparación de medias de la lectura final, donde las hileras centrales fueron la parcela útil. El área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) se calculó conforme a Campbell y Madden (1990) y Shaner y Finney (1977), utilizando la fórmula:

$$ABCDE = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

donde el valor final del ABCDE es la suma de las áreas por lapsos, que resulta de multiplicar la lectura promedio de dos fechas consecutivas (valor de y) por el lapso (días, valor de t) entre lecturas.

Durante los ciclos de cultivo, se colectaron muestras de hojas y tallos con lesiones simples de tizón de cada uno de los tratamientos. Las muestras se colocaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente (22 a 25 °C) con luz blanca durante 24 h para inducir la formación de esporangios y se añadieron sobre la lesión rodajas de papa desinfestadas. Después de 2 días, se observó crecimiento micelial impregnado en los cortes. Se retiraron las puntas del micelio utilizando una aguja de disección, luego se sembraron en medio centeno agar (Alarcón-Rodríguez et al., 2013) con oxitetraciclina y se incubaron a una temperatura constante (17 °C).

Identificación de tipos de compatibilidad

Para determinar el tipo de compatibilidad (A1 o A2), se colocaron aislados “desconocidos” en un extremo de una caja de Petri con medio centeno agar. En el otro

reproduction structures (oogonia, antheridia and oospores). The presence of oospores was interpreted as if the unknown isolate were from an opposite compatibility group to that of the confrontation. The presence of oospores when confronting the isolate with both types of known compatibility, or without confrontation, was interpreted as homothallic (H).

Resistance to fungicides *in vitro*

The evaluation of the resistance/susceptibility *in vitro* of the isolates to the fungicides applied in the field was carried out according to the methodology of Shattock (1988) and Deahl, DeMuth, Sinden, and Rivera-Peña (1995b). Mycelial fragments of the oomycete, isolated from the two crop cycles, were plated in selective rye-agar media with the fungicides added (0.1 and 10 mg·L⁻¹). The growth *in vitro* of each isolate was measured after an incubation period of 10 days at 17 °C, and the result was quantified with the equation:

$$PC = \left(\frac{DMCM - 5}{DMCA - 5} \right) 100$$

where *PC* = percentage of growth; *DMCM* = mean colony diameter (mm), 5 = diameter of the cylinder with mycelia originally sown at the center of the Petri dish (DM, diameter; C, cylinder; M, mycelia); and *DMCA* = diameter of the growth of the control without fungicides (DM, diameter; C, cylinder of growth, A, agar fungicide-free). For the classification, the criteria employed by Shattock (1988) and Deahl et al. (1995b) were adapted. They qualify the isolates with percentage of growth equal to or higher than 60 % as resistant to metalaxyl, intermediate from 10 % to 60 % growth, and as susceptible those with a percentage of radial growth less than 10 %. The comparison by categories was made in a completely randomized design (Statistical Analysis System [SAS Institute], 2004).

Results and discussion

Isolates and progress of the disease curve

P. infestans was highly sensitive to the fungicides during the first cycle, and all the isolates obtained were of the A1 mating type. In the second year all of the isolates were homothallic (Table 1). The A1 mating type is the most abundant in nature, and is the type that was dispersed throughout the world in the mid XIX century, but it is genetically limited, so it tends to be clonally conserved without much variation (Judelson, 1996).

Considering the absence of selection pressure in the zone prior to the assays due to the absence of commercial potato crops, it was expected that the population of *P. infestans* would be wild, predominating the above mentioned mating type and little infection

extremo de la caja, se sembró un aislado de referencia de tipo conocido (A1 o A2, proporcionado por la Dra. Sylvia P. Fernández Pavía de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) y se mantuvo a 17 °C en oscuridad. Después de una semana, se evaluaron las colonias para determinar su capacidad de desarrollar estructuras de reproducción sexual (ovogonia, anteridios y oosporas). La presencia de oosporas se interpretó como si el aislado desconocido fuese de un grupo de compatibilidad opuesto al de la confrontación; además, al enfrentar el aislado con ambos tipos de compatibilidad conocidos, o sin la confrontación, se interpretó como homotático (H).

Resistencia a fungicidas *in vitro*

La evaluación *in vitro* de la resistencia/susceptibilidad de los aislados a los fungicidas aplicados en condiciones de campo abierto se llevó a cabo conforme a la metodología de Deahl, DeMuth, Sinden, y Rivera-Peña (1995b) y Shattock (1988). Se sembraron fragmentos de micelio del oomiceto, aislados de los dos ciclos de cultivo, en medio centeno agar selectivo adicionado con los fungicidas (0.1 y 10 mg·L⁻¹). El crecimiento *in vitro* de cada aislado se midió después de 10 días de incubación a 17 °C y el resultado se cuantificó mediante la ecuación:

$$PC = \left(\frac{DMC - 5}{DCA - 5} \right) 100$$

Donde *PC* = porcentaje de crecimiento, *DMC* = diámetro medio de la colonia (mm), 5 = diámetro del cilindro con micelios originalmente sembrados en el centro de la caja de Petri (mm) y *DCA* = diámetro de crecimiento del control sin fungicidas. Para la clasificación, se adaptaron los criterios empleados por Deahl et al. (1995b) y Shattock (1988), quienes califican a los aislados con porcentaje de crecimiento igual o superior a 60 % como resistentes al metalaxil, de 10 a 60 % como intermedios e inferior a 10 % como susceptibles. La comparación por categorías se realizó en un diseño completamente al azar (Statistical Analysis System [SAS Institute], 2004).

Resultados y discusión

Aislados y curva de desarrollo de la enfermedad

El *P. infestans* resultó altamente sensible a los fungicidas durante el primer ciclo, y todos los aislados obtenidos fueron del tipo A1. En el segundo año, todos los aislados fueron homotáticos (Cuadro 1). El tipo de compatibilidad A1 es el más abundante en la naturaleza, pero es genéticamente limitado, por lo que tiende a conservarse clonalmente sin mucha variación (Judelson, 1996). Este tipo se esparció en todo el mundo a mediados del siglo XIX.

Teniendo en cuenta la ausencia de presión de selección

Table 1. Number of isolates and mating type per year.**Cuadro 1. Número de aislados y tipo de compatibilidad por año.**

Active ingredient / Ingrediente activo	No. and MT ^z (2011) / Núm. y GC ^z (2011)	No. and MT (2012) / Núm. y GC (2012)
Metalaxil	3 A1	13 H
Fosetyl-A1	3 A1	12 H
Mandipropamid / Mandipropamida	5 A1	4 H
Ciazofamid / Ciazofamida	7 A1	0
Control	5 A1	28 H
Total	23 A1	57 H

^zMT: mating type (A1 and H [homothallic]).

^zGC: grupo de compatibilidad (A1 o H [homotático]).

in the treatments with the agrochemicals; thus, few were obtained in 2011. For the following year, all were homothallic, including the control, as evidence of the presence of these types that would bloom as a consequence of the situation of the previous year, given that both assays were established in the same plots in the two consecutive years.

Given that the oomycete population in the Chapingo area is quite wild because of the absence of a selection pressure (fungicides) in its natural environment, in the first year most of the A1 mating type (highly sensitive to fungicides) was eliminated, with no detection of homothallic populations that far. As a consequence, in the second year all of the pathogens present in the area were homothallic. This character had already been reported in Chapingo (Alarcón-Rodríguez et al., 2013) and in the Toluca Valley (López-Orona et al., 2013). The clonal nature of the isolates from Chapingo (all A1 the first year and all homothallic the second year) was later confirmed by microsatellite genotyping (Shakya, Larsen, Cuenca-Condoy, Lozoya-Saldaña, & Grünwald, 2016).

Percentage of infection

At the end of the two growing cycles, 100 % infection was detected in the unprotected controls. In 2011, the treatments that showed the highest protection were mandipropamid and metalaxyl, with 22 and 39 % infection, respectively, which was directly reflected in the value of the AUDPC (44 and 99, respectively, Figure 1, Table 2). In 2012 the treatment with the highest protection was again mandipropamid, with nearly 21 % final infection (AUDPC of 24), whereas metalaxyl permitted 87 % final foliar infection and 176 of AUDPC, and with the exception of mandipropamid, the rest of the fungicides allowed higher infection the second year with respect to the first (Figure 1, Table 2). This could be due to the selection pressure of the products on the pathogen during the previous cycle. Furthermore, in this second year the entire population of *P. infestans* was homothallic, which suggests that the pathogen could show higher genetic variability in 2012 than the previous year.

en la zona previa a los ensayos debida a la falta de cultivos comerciales de papa, se esperaba que la población de *P. infestans* fuese silvestre, predominando el tipo de compatibilidad mencionada arriba y poca infección en los tratamientos con los agroquímicos, por lo que se obtuvieron pocos en 2011 (Cuadro 1). Para el año siguiente, todos fueron homotáticos, incluido el control, como evidencia de la presencia de estos tipos que aflorarían como una consecuencia de la situación del año anterior, dado que ambos ensayos se establecieron en las mismas parcelas en los dos años consecutivos.

Debido a que la población de oomicetos en el área de Chapingo es silvestre, ocasionada por la ausencia de presión de selección (fungicidas) en su ambiente natural, en el primer año la mayoría del tipo de compatibilidad A1 (muy sensible a fungicidas) se eliminó, sin detección de poblaciones homotáticas hasta entonces. Como consecuencia, en el segundo año todos los patógenos presentes en el área fueron homotáticos. Esta característica ya había sido reportada en Chapingo (Alarcón-Rodríguez et al., 2013) y en el Valle de Toluca (López-Orona et al., 2013). La naturaleza clonal de los aislados de Chapingo (todos A1 el primer año y todos homotáticos el segundo año) se confirmó posteriormente mediante la determinación de genotipos vía microsatélites (Shakya, Larsen, Cuenca-Condoy, Lozoya-Saldaña, & Grünwald, 2016).

Porcentaje de infección

Al final de los dos ciclos de crecimiento se detectó 100 % de infección en los controles no protegidos. En 2011, los tratamientos que mostraron la protección más alta fueron la mandipropamida y el metalaxil, con 22 y 39 % de infección, respectivamente; lo que se reflejó directamente en el valor del ABCDE (44 y 99, respectivamente, Figura 1 y Cuadro 2). En 2012, el tratamiento con la mayor protección fue nuevamente la mandipropamida, con cerca de 21 % de infección final (ABCDE de 24); en tanto que el de metalaxil presentó 87 % (ABCDE de 176). Con excepción de la mandipropamida, el resto de los fungicidas permitió una infección más

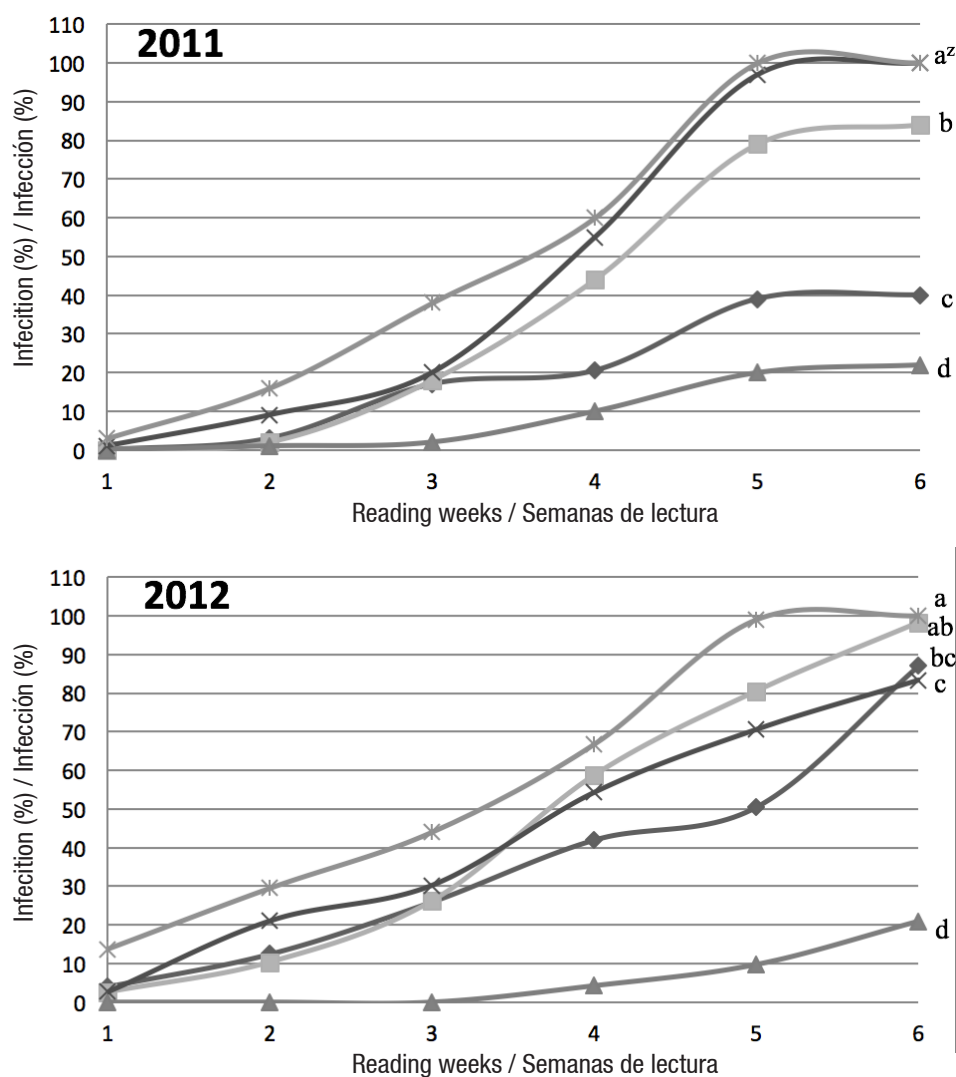


Figure 1. Progress of foliar infection: ◆ metalaxil, ■ fosetyl-Al, ▲ mandipropamid, ✕ ciazofamid, * control.

^aLines with the same letter do not differ statistically (Tuckey, $P \leq 0.05$).

Figura 1. Desarrollo de la infección foliar: ◆ metalaxil, ■ fosetil-Al, ▲ mandipropamida, ✕ ciazofamida, * control. ^aLíneas con la misma letra no difieren estadísticamente (Tuckey, $P \leq 0.05$).

Table 2. Final reading of foliar infection and area under the disease progress curve (AUDPC).

Cuadro 2. Lectura final de la infección foliar y área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE).

Treatment/ Tratamiento	Last reading 2011/ Última lectura 2011	AUDPC 2011/ ABCDE 2011	Last reading 2012/ Última lectura 2012	AUDPC 2012/ ABCDE 2012
Metalaxil	39.0 c ^a	99	87.0 bc	176
Fosetyl-Al	83.2 b	185	98.2 ab	226
Mandipropamid/ Mandipropamida	22.0 d	44	20.9 d	24
Ciazofamid/ Ciazofamida	99.5 a	231	84.2 c	219
Control	100.0 a	265	100.0 a	296

^aMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

^aMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

In the *in vitro* evaluations, the isolates grew over rye agar with 0.1 and 10 mg·L⁻¹ of the active ingredients. These doses were defined as a function of reports by Deahl, DeMuth, and Fry (1995a), Locher and Lorenz (1991), Marquinez (1995), Rekanović et al. (2011), Shattock (1988) and Sozzi, Schwinn, and Gisi (1992) who reported colonies with 2 to 100 % growth with respect to the controls.

Regarding the isolates exposed to cyazofamid in the field and *in vitro*, all of the isolates were sensitive in both crop cycles (Figure 2). The mode of action of this fungicide is fundamental for not developing resistance in

alta durante el segundo año respecto del primero (Figura 1, Cuadro 2). Lo anterior podría deberse a la presión de selección de los productos sobre el patógeno durante el ciclo anterior. Además, en este segundo año, toda la población de *P. infestans* fue homotática; lo cual sugiere que el patógeno podría mostrar variabilidad genética mayor en 2012 que en 2011.

En las evaluaciones *in vitro*, los aislados crecieron sobre agar centeno con 0.1 y 10 mg·L⁻¹ de los ingredientes activos. Estas dosis se definieron en función de los reportes elaborados por Deahl, DeMuth, y Fry (1995a), Locher y Lorenz (1991), Marquinez (1995), Rekanović

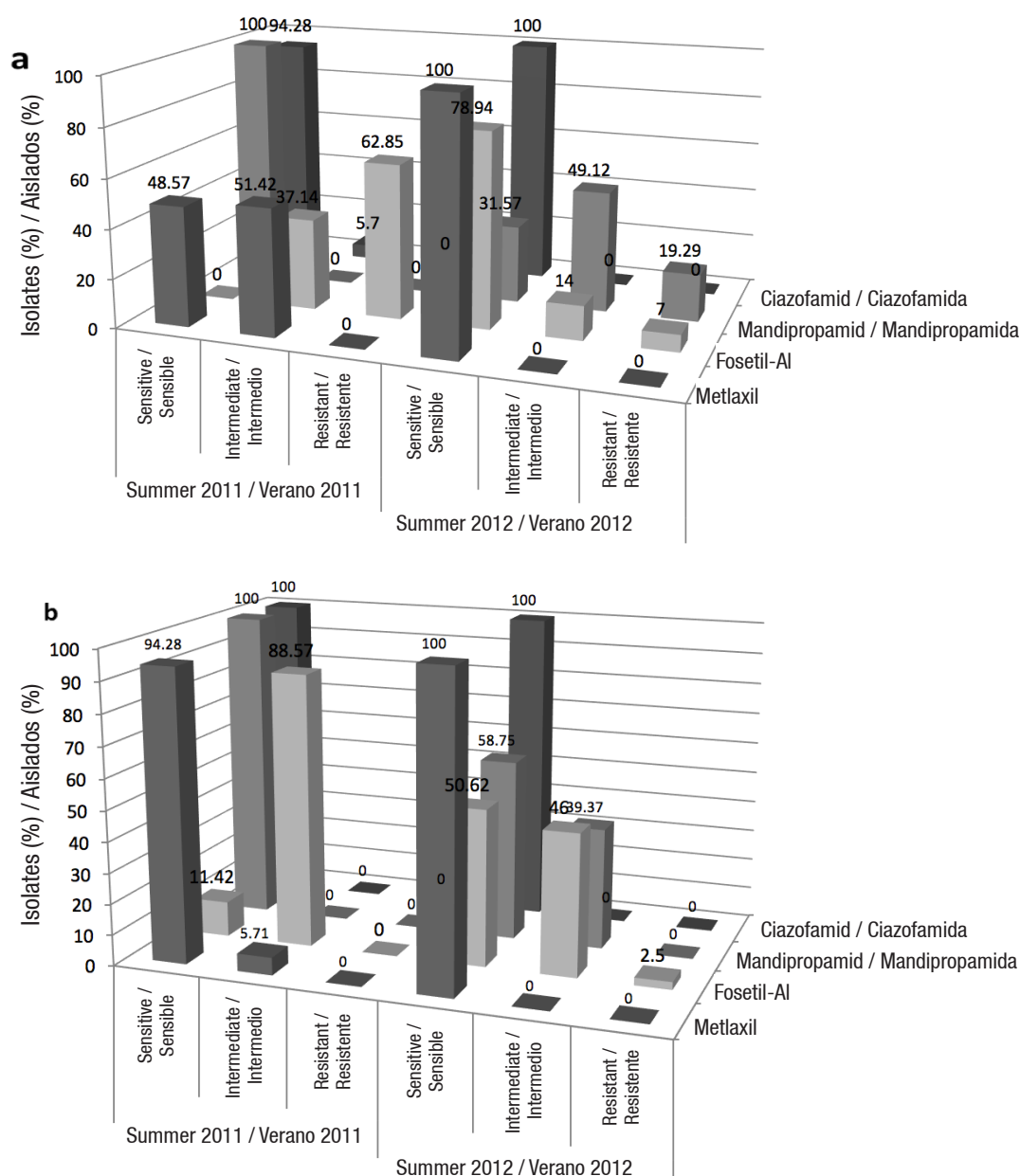


Figure 2. Percentage of sensitive, intermediate and resistant *P. infestans* isolates to the fungicides *in vitro* with respect to the control (100%): a) 0.1 mg·L⁻¹; b) 10 mg·L⁻¹.

Figura 2. Porcentaje de sensibilidad. Aislados de *P. infestans* intermedios y resistentes a los fungicidas *in vitro* con respecto al control (100 %): a) 0.1 mg·L⁻¹ y b) 10 mg·L⁻¹.

the pathogen, given that it is related to the inhibition of the mitochondrial respiratory chain, in the reduction of ubiquinone (Qi) and the oxidation of ubiquinol (Qo) in cytochrome b (Temperli, Roos, & Ithl, 1990), with reduction of ATP. Cyazofamid limits the mobility of the zoospores, as well as the germination of sporangia and the formation of oospores (Ziogas, Markoglow, Theodosiou, Anagnostou, & Boutopoulou, 2006).

General discussion

The geographical area of Chapingo has ideal climatic conditions to grow potatoes, as well as for the development of the late blight disease in the summer. Nevertheless, potatoes are not extensively grown in the area. Thus, we would expect to deal with wild *P. infestans* populations in our assays, highly sensitive to agrochemicals, for there is no selection pressure of the pathogen by fungicides. However, the results came out otherwise. The best treatment in the field was mandipropamid, with consistency in control of the pathogen in both years, but the studies *in vitro* did not show the same results, given that although all of the populations were sensitive to the product *in vitro* the first year, populations bloomed with intermediate and high resistance to this product in the laboratory the second year.

The rest of the products showed inconsistencies in the advance curves of the disease in the field from one year to the next. Metalaxyl, for example, permitted an infection of 39 % in one year and 87 % in another. Furthermore, there was almost total infection in the treatment with cyazofamid the first year and in that of fosetyl-Al the second. This was also reflected in the *in vitro* assays, where the populations exposed to cyazofamid were consistently the most susceptible, without showing resistance, which would be just the opposite from what would be expected when in the field this product did not control the disease.

On the other hand, fosetyl-Al failed to control the blight in the field in both years, but there were intermediate and resistant populations of the oomycete when exposed to the product *in vitro*. The inconsistencies of the oomycete regarding fungicide resistance/sensitivity under *in vivo/in vitro* conditions, as well as from one year to another in the field, do not support behavior predictability. These results expose the great genetic plasticity of the oomycete in relation to its sensitivity to fungicides, and questions the *in vitro* assays of the products as potential fungicides along the development process, because *in vitro* pathogen control does not guarantee the same results *in vivo*.

Conclusions

There was high severity by *Phytophthora infestans* in both years in the field (*in vivo*), where three of the

et al. (2011), Shattock (1988) y Sozzi, Schwinn, y Gisi (1992), quienes reportaron colonias con crecimiento de 2 a 100 % con respecto a los controles.

En cuanto a los aislados expuestos a ciazofamida en campo e *in vitro*, todos fueron sensibles en ambos ciclos de cultivo (Figura 2). El modo de acción de este fungicida es fundamental para no desarrollar resistencia en el patógeno; esto debido a que está relacionado con la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, en la reducción de la ubiquinona (Qi) y la oxidación del ubiquinol (Qo) en el citocromo b (Temperli, Roos, & Ithl, 1990), con reducción del ATP. La ciazofamida limita la movilidad de las zoosporas, así como la germinación de los esporangios y la formación de oosporas (Ziogas, Markoglow, Theodosiou, Anagnostou, & Boutopoulou, 2006).

Discusión general

La zona geográfica de Chapingo cuenta con las condiciones climáticas ideales para cultivar papa, así como para el desarrollo de tizón tardío en el verano. Sin embargo, este cultivo no se produce extensamente en la zona. Por lo tanto, se esperaría tratar con poblaciones silvestres de *P. infestans*, altamente sensibles a los agroquímicos, ya que no hay presión de selección del patógeno causada por fungicidas. No obstante, los resultados fueron opuestos. El mejor tratamiento en campo fue la mandipropamida, con consistencia en el control del patógeno durante ambos años, pero los estudios *in vitro* no mostraron los mismos resultados. Aunque todos los tratamientos resultaron sensibles al producto *in vitro* el primer año, las poblaciones afloraron con resistencia intermedia y alta a este producto en el laboratorio durante el segundo año.

El resto de los productos mostraron inconsistencias en las curvas de avance de la enfermedad en campo de un año a otro. El metalaxil, por ejemplo, permitió una infección de 39 % en un año y de 87 % en el otro. Además, hubo infección casi total en el tratamiento con ciazofamida el primer año y con fosetil-Al el segundo año. Esto también se reflejó en los ensayos *in vitro*, en los que las poblaciones expuestas a la ciazofamida fueron consistentemente las más susceptibles, sin mostrar resistencia; lo cual sería exactamente lo contrario a lo que se esperaría cuando en el campo este producto no controló a la enfermedad.

Por otra parte, el fosetil-Al falló en controlar al tizón en campo en ambos años, pero hubieron poblaciones intermedias y resistentes del oomiceto cuando se expusieron al producto *in vitro*. Las inconsistencias del oomiceto con respecto a la resistencia/sensibilidad a fungicidas bajo condiciones *in vivo/in vitro*, así como de un año a otro en campo, no explican la predictibilidad del

treatments presented curves and values of the disease that were different from one year to another. The half doses of the agrochemicals partially protected foliage, delaying the epidemic but allowing the infection and blooming of strains of *P. infestans* that were resistant to the products. The *in vitro* resistance of the oomycete to the fungicides was partial, depending on the doses to which it was exposed, without coincidence of resistance/susceptibility when compared with its behavior *in vivo* (field). The inconsistency of the behavior of *P. infestans* to these two conditions (*in vivo*, *in vitro*) does not allow the anticipation of responses of the oomycete under diverse situations of selection pressure from agrochemicals, which demonstrates its high genetic plasticity.

End of English version

References / Referencias

- Abad, J. A., & Ochoa, C. (1995). Historical evidence on occurrence of the late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. In: Dowlwey, L. J., Bannon, E., Cooke, R. L., Keane, T., & Sullivan, E. (Eds). *Phytophthora infestans* 150 (pp: 36-41). Dublin, Ireland: Boole Press Ltd.
- Adler, N. F., Erselius, L. J., Chacón, M. G., Flier, W. G., Ordóñez, M. E., Kroon, L., & Forbes, G. A. (2004). Genetic diversity of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology*, 94(2), 154-162. doi: 10.1094/PHTO.2004.94.2.154
- Alarcón-Rodríguez, N. M., Lozoya-Saldaña, H., Valadez-Moctezuma, E., García-Mateos, R., & Colinas-León, M. T. (2013). Genetic diversity of potato late blight, *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, at Chapingo, México. *Agrociencia*, 47(6) 593-607. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952013000600006&script=sci_abstract&tlng=en
- Blum, M., Boehler, M., Randall, E., Young, V., Csukai, M., & Kraus, S. (2010). Mandipropamid targets the cellulose synthase like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 227- 243. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00604.x
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). *Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?*. Belgium: Fungicide Resistance Action Committee. Retrieved from <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf>
- Campbell, C. L., & Madden, L. V. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*. New York, USA: Wiley.
- Cohen, Y., Rubin, E., Hadad, T., Gotlieb, D., Sierotzki, H., & Gisi, U. (2007). Sensitivity of *Phytophthora infestans* to mandipropamid and the effect of enforced selection pressure in the field. *Plant Pathology*, 56(5), 836-842. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01625.x
- comportamiento. Estos resultados ponen de manifiesto la gran plasticidad genética del oomiceto en relación a su sensibilidad a los fungicidas; además, cuestionan los ensayos *in vitro* de los productos como fungicidas potenciales a lo largo del proceso de desarrollo, ya que el control *in vitro* del patógeno no garantiza los mismos resultados *in vivo*.
- ### Conclusiones
- Se presentó severidad alta por *Phytophthora infestans* en ambos años en campo (*in vivo*), donde tres de los tratamientos presentaron curvas y valores de la enfermedad que fueron diferentes de un año a otro. Las medias dosis de los agroquímicos protegieron parcialmente al follaje, retrasando la epidemia pero permitiendo la infección y floración de cepas de *P. infestans* tolerantes a los productos. La resistencia *in vitro* del oomiceto a los fungicidas fue parcial, dependiendo de las dosis a las cuales fue expuesto, sin coincidencia de resistencia/susceptibilidad al compararse con su respuesta *in vivo* (campo). La inconsistencia del comportamiento de *P. infestans*, a estas dos condiciones (*in vivo* e *in vitro*), no permite la anticipación de las respuestas del oomiceto bajo diversas situaciones de presión de selección por parte de los agroquímicos, lo cual demuestra su plasticidad genética alta.
- #### Fin de la versión en español
- Damicone, J. (2004). *Fungicide resistance management*. Oklahoma: Cooperative Oklahoma Extension Service. Retrieved from <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Rendition-3508/F-7663web.pdf>
- Davidse, L., Looijen, C. D., Turkesnteen, L. J., & van der Wal, D. (1981). Occurrence of metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87(2), 65-68. doi: 10.1007/BF01976658
- Deahl, K. L., DeMuth, S. P., & Fry, W. E. (1995a). Genetic and phenotypic diversity in populations of *Phytophthora infestans* in the United States of America. In: Dowlwey, L. J., Bannon, E., Cooke, R. L., Keane, T., & Sullivan, E. (Eds), *Phytophthora infestans* 150 (pp: 362). Dublin, Ireland: Boole Press Ltd.
- Deahl, K. L., DeMuth, S. P., Sinden, S. L., & Rivera-Peña, A. (1995b). Identification of mating types and metalaxyl resistance in North American populations of *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal*, 72(1), 35-49.
- Díaz-de la Cruz, J. B., Lozoya-Saldaña, H., Sahagun-Castellanos, J., & Peña-Lomelí, A. (2014). The pathosystem *Solanum tuberosum* L.-*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo, México. Expected, observed, and simulated. *American Journal of Potato Research*, 91(3), 312-326. doi: 10.1007/s12230-013-9351-y

- Doster, M. A., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (1990). Quantification of factors influencing potato late blight suppression and selection for metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: A simulation approach. *Phytopathology*, 80, 1190-1198. doi: 10.1094/Phyto-80-1190
- Dowley, L. J., & O'Sullivan, E. (1985). Monitoring metalaxyl resistance in population of *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 28, 531-534.
- Drenth, A., Goodwin, S. B., Fry, W. E., & Davidse, L. C. (1993). Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism. *Phytopathology*, 83(10), 1087-1092. doi: 10.1094/Phyto-83-1087
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). Introduction to the genus *Phytophthora*. In: Edwin D. and Ribeiro, O. (Eds.). *Phytophthora diseases worldwide* (pp. 1-7). St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.
- Evenhuis, A., Schepers, H. T., Bus, C. B., & Stegeman, W. (1996). Synergy of cymoxanil and mancozeb when used to control potato late blight. *Potato Research*, 39(4), 551-559. doi: 10.1007/BF02358474
- Forbes, G. A., Escobar, X. C., Ayala, C. C., Revelo, J., Ordoñez, M. E., Fry, B. A., Dovcett, K., & Fry W. E. (1997). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*, 87(4), 375-380. doi: 10.1094/PHTO.1997.87.4.375
- Garay-Serrano, E., Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G., Flier, W. G., Lozoya-Saldaña, H., Rojas-Martínez, R. I., Goss, E. M., & Grünwald, N. J. (2007). First report of haplotype I-b of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in Central Mexico. *Plant disease*, 91(7), 909. doi: 10.1094/PDIS-91-7-0909B
- Gisi, U., & Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 549-572. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.549
- Gómez, D. E., & Reis, E. M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química viva*, 10, 6-17.
- Goodwin, S. B. (1996) Origin and ecology of *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 14, 143-147.
- Goodwin, S. B., Sujkowski, L. S., & Fry, W. E. (1995). Rapid evolution of pathogenicity with clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology*, 85(6), 669-76.
- Griffiths, R. G., Dancer, J., O' Neill, E., & Harwood, J. L. (2003). A madelamide pesticide alters lipid metabolism in *Phytophthora infestans*. *New Phytologist*, 158, 345-353.
- Grünwald, N. J., Sturbaum, A. K., Romero, G., Garay, E., Lozoya, H., & Fry, W. E. (2006). Selection for Fungicide Resistance within a Growing Season in Field Populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. *Phytopathology*, 96(12), 1397-1403. doi: 10.1094/PHTO-96-1397
- Grünwald, N. J., Flier, W. G., Sturbaum, A. K., Garay, E., Van Den Bosch, T. B., Smart, C. D., Matuszak, J. M., Lozoya, H., Turkensteen, L. J. & Fry, W. E. (2001). Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathology*, 91(9), 882-890. doi: 10.1094/PHTO.2001.91.9.882
- Grünwald, N. J., & Flier, W. G. (2005). The Biology of *Phytophthora infestans* at Its Center of Origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 171-190. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906
- Henfling, J. W. (1987). *Late blight of potato: Phytophthora infestans*. *Technical Information Bulletin 4*. Lima, Peru: International Potato Center.
- Judelson, H. S. (1996). Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular General Genetics*, 252(1-2), 155-161.
- Kato, M., Mizubuti, E. S., Goodwin, S. B., & Fry, W. E. (1997). Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology*, 87(9), 973-980. doi: 10.1094/PHTO.1997.87.9.973.
- Knapova, G., Tenzer, I., Gessler, C., & Gisi, U. (2001). Characterization of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with molecular markers. *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology*. Biodiversity in Plant Pathology. Taormina, Italy.
- Locher, F. J., & Lorenz, G. (1991). Methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to ditiocarbimide fungicides. *EPPO Bulletin*, 21(2), 341-345. doi: 10.1111/j.1365-2338.1991.tb01261.x
- López-Orona, C. A., Martínez, A. R., Arteaga, T. T., García, H. G., Palmero, D., Ruiz, A., & Peñuelas, C. G. (2013). First report of homothallic isolates of *Phytophthora infestans* in commercial potato crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley, Mexico. *Plant Disease*, 97(8), 1112. doi: 10.1094/PDIS-10-12-0962-PDN
- Marquinez, R. (1995). Resistance of *Phytophthora infestans* strains to phenylamides in Spain. In: Dowley, L. J., Bannon, E., Cooke, L. R., Keane, T., & O'Sullivan, E. (Eds.), *Phytophthora infestans 150* (pp 137-141). Dublin. Ireland: EAPR, Boole Press Ltd.
- Matuszak, J. M., Fernández, J., Gu, W. K., Villarreal, M. J., & Fry, W. E. (1994). Sensivity of *Phytophthora infestans* population to Metalaxyl in México; distribution and dynamics. *Plant Disease*, 78(9), 911-916. doi: 10.1094/PD-78-0911
- Power, R. J., Hamlen, R. A., & Morehart, L. A. (1995). Variation in sensitivity of *Phytophthora infestans* field isolates to cimoxanil, chlorothalonil and metalaxyl. In: Dowley, L. J., Bannon E., Cooke, L. R., Keane, T., & O'Sullivan, E. (Eds.), *Phytophthora infestans 150* (pp 154-159). Dublin. Ireland: EAPR, Boole Press Ltd.
- Rekanović, E., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Stepanović, M., Todorović, B., & Mihajlović, M. (2011). Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science*, 47(5), 403-409. doi: 10.1080/03601234.2012.657043
- Robledo-Esqueda, M. N., Lozoya-Saldaña, H., & Colinas-León, M. T. (2012). Inducción de defensa en papa (*Solanum*

- tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* Mont. de Bary, por fungicidas. *Interciencia*, 37(9), 689-695. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/339/33925502006/>
- Runno, E., & Koppel, M. (2006). The question of metalaxyl resistance on late blight fungus in Estonia. *Agronomy Research*, 4, 341-344. Retrieved from <http://agronomy.emu.ee/vol04Spec/p4S44.pdf>
- Serrano-Cervantes, R., Lozoya-Saldaña, H., Colinas y León, M. T. B., & Leyva-Mir, S. G. (2016). Algunas alteraciones enzimáticas en papa causadas por fungicidas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(1), 25-31. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000100006
- Shakya, S. K., Larsen, M. M., Cuenca-Condoy, M. M., Lozoya-Saldaña, H., & Grünwald, N. J. (2016). Microsatellite genotyping reveals high genetic diversity in *Phytophthora infestans* from Mexico. *Proceedings, American Phytopathological Society Annual Meeting*, Tampa, Florida, USA.
- Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox Wheat. *Phytopathology*, 67, 1051-1056. doi: 10.1094/Phyto-67-1051
- Shattock, R. C. (1988). Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 37(1), 4-11. doi: 10.1111/j.1365-3059.1988.tb02188.x
- Sozzi, D., Schwinn, F. J., & Gisi, U. (1992). Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamides: a leaf disease method. *EPPO Bulletin*, 22 (2), 306-309. doi: 10.1111/j.1365-2338.1992.tb00499.x
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2004). *SAS/STAT*® 9.1. Cary, NC, USA: Author.
- Temperli, E., Roos, U. P., & Ithl, H. R. (1990). Actin and tubulin cytoskeletons in germlings of the oomycete fungus *Phytophthora infestans*. *European Journal of Cell Biology*, 53(1), 75-88.
- Ziogas, B. N., Markoglou, A. N., Theodosiou, D. I., Anagnostou, A., & Boutopoulou, S. (2006). A high multi-drug resistance to chemically unrelated oomycete fungicides in *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 115(3), 283-292. doi: 10.1007/s10658-006-9007-6