



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

“Caracterización poblacional, transcriptómica y análisis funcional de *Phytophthora infestans* en Argentina para la incorporación de resistencia al tizón tardío de la papa”

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Marcelo Ezequiel Juarez

Directora de tesis: Dra. María Eugenia Segretin

Consejero de Estudios: Dr. Jorge Muschietti

Lugar de trabajo:

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr.
Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET)**

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 31 de marzo de 2025

Resumen

La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo clave para la alimentación humana, y Argentina es el tercer productor de América Latina. Sin embargo, el tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans*, afecta severamente su producción. Las variedades más cultivadas en Argentina, como Spunta y Kennebec, son susceptibles a este patógeno, por lo que su control depende del uso de fungicidas preventivos. Para desarrollar estrategias de control más sustentables, es clave la incorporación de genes de resistencia (R) en programas de mejoramiento, lo que requiere una caracterización detallada del patógeno en la región.

Este trabajo caracteriza aislamientos argentinos de *P. infestans* obtenidos entre 2019 y 2021 mediante microsatélites y secuenciación de amplicones. Se compararon con aislamientos de otros países, confirmando que todos pertenecen al genotipo EU_2_A1. Se secuenció el genoma de un aislamiento representativo, PiNSL-19, determinando su triploidía y la pérdida de 17 genes efectores, incluido *AVR1*, que es reconocido por el único gen de resistencia presente en Spunta y Kennebec (*R1*). Se identificaron polimorfismos en otros efectores relevantes para el reconocimiento por genes R.

Mediante transcriptómica, se analizó la expresión de genes efectores en planta a 0, 24, 48 y 72 h post-inoculación en Spunta, evidenciando patrones de expresión diferencial. Finalmente, ensayos en *Nicotiana benthamiana* transgénica con genes R mostraron una fuerte respuesta inmune en líneas con *Rpi-amr1*, *Rpi-amr3* y *Rpi-blb2*.

Estos resultados constituyen la primera caracterización genómica y transcriptómica de un aislamiento de *P. infestans* en Argentina, proporcionando información clave para el mejoramiento genético y el control de la enfermedad en el país.

Palabras clave: *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*, efectores, genómica, transcriptómica, *Nicotiana benthamiana*, genes R, inmunidad, fitopatología, cultivos.

Abstract

Population characterization, transcriptomics, and functional analysis of *Phytophthora infestans* in Argentina for the incorporation of resistance to potato late blight

Potato (*Solanum tuberosum*) is a key crop for human consumption, with Argentina being the third-largest producer in Latin America. However, late blight, caused by *Phytophthora infestans*, severely affects its production. The most widely cultivated varieties in Argentina, such as Spunta and Kennebec, are susceptible to this pathogen, making disease control reliant on preventive fungicide applications. To develop more sustainable control strategies, incorporating resistance (R) genes into breeding programs is essential, which requires a detailed characterization of the pathogen in the region.

This study characterizes Argentine *P. infestans* isolates collected between 2019 and 2021 using microsatellites and amplicon sequencing. These were compared with isolates from other countries, confirming that all belong to the EU_2_A1 genotype. The genome of a representative isolate, PiNSL-19, was sequenced, revealing its triploidy and the loss of 17 effector genes, including *AVR1*, which is recognized by the only resistance gene present in Spunta and Kennebec (*R1*). Polymorphisms were also identified in other effectors relevant for recognition by R genes.

Through transcriptomics, we analyzed effector gene expression in planta at 0, 24, 48, and 72 hours post-inoculation in Spunta, revealing differential expression patterns. Finally, infection assays in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants carrying R genes showed a strong immune response in lines with *Rpi-amr1*, *Rpi-amr3*, and *Rpi-blb2*.

These results provide the first genomic and transcriptomic characterization of a *P. infestans* isolate from Argentina, offering crucial insights for genetic improvement and disease control in the country.

Keywords: *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*, effectors, genomics, transcriptomics, *Nicotiana benthamiana*, R gene, immunity, plant pathology, crop protection.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional y su amor. Especialmente a mis padres, quienes desde mi infancia hasta hoy han entregado todo por mi formación y felicidad. Agradezco también a todas las personas que, de una forma u otra, estuvieron presentes en mi paso por el INGEBI. A Vero, Cata, Juanelo y los incontables mates que compartimos a lo largo de estos años en el pasillo del laboratorio. A Caro, Mora, Noe, Mauro, Valentina y los Fedes, que aunque con menos mates, también compartieron muchas alegrías, éxitos y fracasos conmigo.

A Pablo, el compañero de pandemias. El encierro me encontró junto a un gran amigo que me acompañó en mis primeros pasos en R y bash, cuando necesitaba su ayuda hasta para renombrar una columna en una tabla. A la nutrición a base de galletitas pepas, Bojack, The Office, Mirana, las peleas terraplanistas de esos años. Al viejo y al mono, que por ahí andan.

Un agradecimiento especial para Euge, mi directora, quien logró guiar sin imponer y alentar sin forzar mi progreso durante el doctorado. Su amabilidad me ayudó a dismantelar preconceptos sobre la relación jefe-becario y a descubrir su brillante humanidad y proactividad. A Fer, cuya gentileza y facilidad de trato, en algunos momentos, casi me hicieron olvidar el tremendo referente que tengo a mi lado en el campo de la biotecnología vegetal, aunque siempre me lo recordaba con la precisión de cada sugerencia o intervención.

A Yamila (los pasteles), mi pareja y salvavidas, cuya inteligencia, humor y paciencia fueron el sostén de mi salud mental para llevar adelante esta tesis. A Bri, el legado, el futuro, la inocencia y la bondad en un gran paquete.

Por último, agradezco a la universidad pública, gratuita y de calidad. Sin ella, no habría tenido la oportunidad de ser licenciado, y mucho menos de aspirar a un doctorado. Me ofreció una formación académica excelente, promoviendo el trato horizontal entre docentes y estudiantes. A la UNLu y a la UBA en especial, les debo tanto.

Capítulo II:	53
Estudio de la expresión in planta de genes de.....	53
<i>P. infestans</i> PiNSL-19 durante la interacción con.....	53
<i>S. tuberosum</i> var Spunta	53
Expresión de genes in planta de <i>P. infestans</i> PiNSL-19 durante la infección de <i>S. tuberosum</i> var. Spunta	54
Enriquecimiento funcional de genes de PiNSL-19 inducidos durante la colonización de papa Spunta	60
Expresión diferencial de un conjunto de efectores de relevancia agronómica	61
Familias de efectores <i>AVRblb2</i> y <i>AVR2</i> : análisis de perfiles de expresión en PiNSL-19 durante la infección en Spunta	66
Validación de datos de expresión génica obtenidos por <i>RNA-Seq</i> mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	69
Identificación <i>de novo</i> de efectores en el transcriptoma de PiNSL-19	70
Capítulo III:	74
Evaluación de la agresividad de aislamientos de	74
<i>P. infestans</i> en variedades comerciales de papa y líneas	74
Transgénicas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	74
Respuesta de las variedades de papa Spunta, Kennebec e Innovator a aislamientos argentinos de <i>P. infestans</i>	75
Agresividad medida a través del área de lesión.....	75
Agresividad medida por producción de esporangios	77
Respuesta de plantas transgénicas de <i>N. benthamiana</i> expresando genes <i>R</i> a aislamientos argentinos de <i>P. infestans</i>	78
DISCUSIÓN.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS	92
Preparación del medio Agar Centeno Sacarosa 2%	93
Aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i> de material vegetal infectado	93
Mantenimiento de cepas de <i>P. infestans</i>	93
Inducción de la zoosporogénesis para los ensayos de infección	94
Extracción de ADN mediante protocolo de CTAB	94
Identificación de <i>P. infestans</i> mediante secuenciación de regiones ITS	94
Ensayos de infección en planta entera: Experimentos de RNA-Seq y qPCR.....	95
Ensayos de infección en hoja desprendida: agresividad por área de lesión	95
Ensayos de infección en discos de hoja: agresividad por producción de esporangios	96
Extracciones de ARN	96
Amplificación de marcadores SSR	96

Secuenciación de panel de amplicones y análisis poblacional.....	98
Secuenciación del genoma completo y análisis genómico del aislamiento PiNSL-19.....	100
Análisis de genómica comparativa.....	101
Secuenciación de ARN y análisis	101
Validación de la expresión génica con qPCR	103
ANEXO.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	114

INTRODUCCIÓN

Distribución y relevancia de la producción de papa en Argentina y el mundo

La papa (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* y otras) es el cultivo más importante para consumo humano, después de los cereales (Devaux *et al.*, 2021). Es uno de los cultivos más eficientes por producir una gran cantidad de alimento nutritivo en menos tiempo y utilizando menos tierra y agua. Su relevancia radica en su alto contenido de agua, almidón (18-20% de su peso seco) y minerales (Liu *et al.*, 2007). Tiene un alto contenido de calorías (la mayor cantidad de proteínas de buena calidad entre los cultivos de raíces y tubérculos), y altas cantidades de vitamina C y potasio. Además, es fuente de vitaminas del complejo B y de minerales como el fósforo y el magnesio (Bonniervale *et al.*, 2012; Nassar *et al.*, 2010).

La papa es un alimento fundamental para satisfacer la demanda de seguridad alimentaria. Su producción mundial alcanza aproximadamente 376 millones de toneladas siendo China, India y Ucrania los principales productores (FAO 2021). Aunque es originaria de los Andes peruanos y está mejor adaptada a climas templado-fríos, se ha expandido a áreas tropicales y subtropicales, lo que ha aumentado su susceptibilidad a enfermedades que afectan severamente la productividad.

Argentina produce un promedio de 2,9 millones de toneladas anuales en una superficie de 75-80 mil hectáreas, ubicándose como el tercer productor de papa en América Latina, después de Perú y Brasil (Devaux *et al.*, 2021). Argentina posee condiciones agroclimáticas que posibilitan el desarrollo del cultivo de papa en varias regiones y en distintas épocas del año. Las principales regiones productoras de papa, según la superficie cultivada en 2019/20, son: Buenos Aires 55%, Córdoba-San Luis 28,8%, Tucumán 7,7%, Mendoza 5,3%, un 1,7% Jujuy-Salta y 1,2% Santa Fe. El resto de la superficie la generan San Juan, Chubut y Río Negro ([Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023](#)) (Figura 1).

En Argentina, el consumo de papa es de aproximadamente 40,8 kg por habitante al año, provenientes de las 15 variedades que se cultivan localmente ([Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023](#)). La variedad Spunta es la más comercializada debido a su alto rendimiento (representando más del 70% del mercado) aunque es muy susceptible a enfermedades. Otros cultivares destacados son Innovator, Atlantic y Kennebec, que se utilizan para producir alimentos procesados en varios formatos (papas fritas, puré deshidratado, bastones y rodajas) ([Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023](#)).

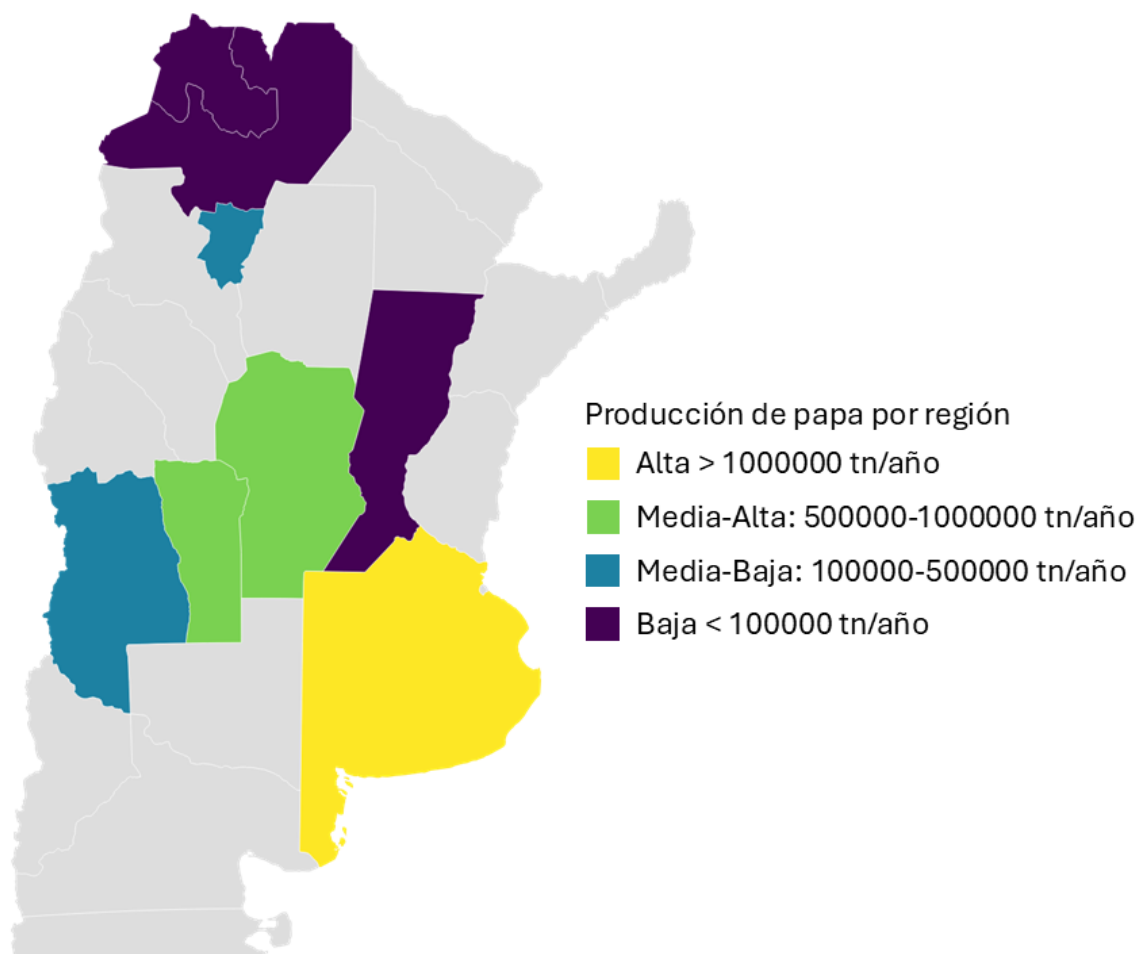


Figura 1: Producción de papa en Argentina: Mapa de Argentina subrayando las principales áreas de producción de papa en Argentina por cantidad de toneladas. Las provincias de Córdoba y San Luis así como las de Salta y Jujuy fueron consideradas en conjunto, ya que comparten zonas productivas. La escala de color representa la producción anual por toneladas. Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Elaborado con Datawrapper.

El cultivo de papa puede verse afectado por factores abióticos, como la salinidad y el estrés hídrico, y por factores bióticos, incluyendo una amplia diversidad de plagas, nematodos, patógenos filamentosos, bacterianos, virus, viroides y micoplasmas. A pesar de los avances en tecnologías agrícolas y el uso de agroquímicos, las pérdidas de rendimiento siguen siendo significativas (van Esse et al., 2020).

En este contexto, los fitopatógenos representan una amenaza creciente, causando pérdidas del 11% al 30% en los cultivos (Savary et al., 2019). El aumento de la incidencia de enfermedades y plagas en las últimas décadas se ha visto favorecido por la intensificación agrícola, la homogeneidad genética de los cultivos y las alteraciones ambientales, factores

que también contribuyen a la emergencia y diseminación de nuevos patógenos (Garret et al., 2021; Bebber et al., 2014).

En este escenario, los cultivos de alimentos básicos desempeñan un papel fundamental para sostener la seguridad alimentaria global. Entre los patógenos filamentosos (hongos y oomicetes) más problemáticos que afectan al cultivo de papa se encuentran *Phytophthora infestans* (“tizón tardío”), *Rhizoctonia solani* (“cancro del tallo”) y *Alternaria solani* (“tizón temprano”) (Devaux et al., 2021; Huarte & Capezzio, 2013; Miller, 1976).

Tizón tardío de la papa: importancia histórica y económica

P. infestans fue el fitopatógeno responsable de la Gran Hambruna Irlandesa, que se extendió entre 1845 y 1857. Durante este período, la papa era un alimento básico para la población irlandesa; sin embargo, la aparición del tizón tardío aniquiló las cosechas de papas durante varios años consecutivos (Geber et al., 2019; Savary et al., 2017). La hambruna resultante fue catastrófica, con aproximadamente un millón de personas muriendo de hambre y enfermedades relacionadas, y más de un millón de emigrantes.

Actualmente, el tizón tardío sigue siendo una de las mayores amenazas para la producción de alimentos a nivel mundial, causando pérdidas económicas estimadas en 3 mil millones de dólares anuales (Haverkort et al., 2009; Kamoun et al., 2015; Cucak et al., 2021). Estas pérdidas tienen un impacto particular en la seguridad alimentaria de los países en desarrollo, donde la papa es un alimento básico importante y las pérdidas de productividad en los cultivos pueden amenazar gravemente la disponibilidad de alimentos (Fisher et al., 2012).

En Argentina, el tizón tardío de la papa es una de las enfermedades más graves en las zonas productoras de papa. Bajo condiciones de temperatura templada y alta humedad o lluvias abundantes, puede causar grandes pérdidas económicas, de hasta el 50% del rendimiento (Bouzo, 2009). Este problema se agrava debido a que los dos cultivares de papa más extendidos en Argentina (*Spunta* y *Kennebec*), que abarcan más del 80% de la superficie sembrada, son susceptibles a *P. infestans* (Caldiz, 2007; Andreu et al., 2010).

Características biológicas y epidemiología de *P. infestans*

P. infestans pertenece al reino Chromista, clase Oomycetes, orden Peronosporales (Whisson et al., 2016). Presenta un micelio cenocítico sin septos y desarrolla conidióforos ramificados. *Phytophthora infestans* es un patógeno hemibiotrófico que tiene una fase de

infección biotrófica inicial (Glazebrook, 2005; Botero *et al.*, 2018) durante la cual el patógeno se propaga dentro del tejido del hospedante, seguida de una fase necrotrófica caracterizada por la inducción de la muerte de las células infectadas (Dodds & Rathjen, 2010). La enfermedad puede afectar hojas, tallos, tubérculos (en el caso de las papas) y frutos (en el caso de los tomates).

P. infestans se reproduce tanto sexual como asexualmente (Figura 2), sin embargo, el crecimiento repentino en biomasa y el establecimiento de grandes poblaciones suele darse a través de la reproducción asexual. Los esporangios, portadores de las esporas asexuales (llamadas zoosporas), se desprenden fácilmente, especialmente en respuesta a cambios en la humedad relativa, y pueden dispersarse por el aire y por agua a otros tejidos de la planta (Aylor *et al.*, 2001). En presencia de agua o alta humedad, los esporangios germinan ya sea por la formación de un tubo germinal que eventualmente crece para formar micelio (germinación directa) o por la diferenciación del citoplasma dentro del esporangio en zoosporas discretas que luego se liberan a través de un poro de salida (germinación indirecta) (Erwin & Ribeiro, 1998). La germinación directa se favorece a temperaturas iguales o superiores al óptimo para el crecimiento del micelio (20-25°C). Por otro lado, la germinación indirecta se favorece a temperaturas inferiores a 15°C. Cuando los esporangios se depositan en una superficie y se exponen a humedad libre y temperaturas frescas, pueden germinar indirectamente liberando entre 8 y 12 zoosporas biflageladas, cada una capaz de iniciar una infección. Por lo tanto, las bajas temperaturas (10-15°C) tienen más probabilidades de conducir a infecciones exitosas que las altas temperaturas (22-26°C) (Melhus, 1915). *P. infestans* tiene un ciclo de vida policíclico, es decir, tiene múltiples ciclos de infección durante el mismo brote. Las lesiones en las hojas infectadas producen esporangios, algunos de los cuales se dispersan a otras partes de las mismas hojas, otras hojas o plantas. Cuando estos esporangios se depositan en nuevo tejido sano, algunos de ellos lograrán causar nuevas infecciones. Estas nuevas infecciones resultan en nuevas lesiones, nuevos esporangios y luego infecciones adicionales. Por lo tanto, el ciclo de vida asexual de *P. infestans* puede completarse rápidamente con la producción de un gran número de esporangios que se dispersan fácilmente (Fry & Goodwin, 1997).

P. infestans es heterotálico, es decir, requiere ambos tipos de apareamiento (designados como A1 y A2) para que ocurra la reproducción sexual. La oospora es la estructura formada por la reproducción sexual, y funciona además como estructura de supervivencia pudiendo persistir hasta cuatro años en el suelo (Mayton *et al.*, 2000, Turkensteen *et al.*, 2008). Sobrevive muy bien a temperaturas muy bajas, pero no a temperaturas más altas, siendo incapaz de sobrevivir 2 horas a 46°C o 12 horas a 40°C (Fay & Fry, 1997).

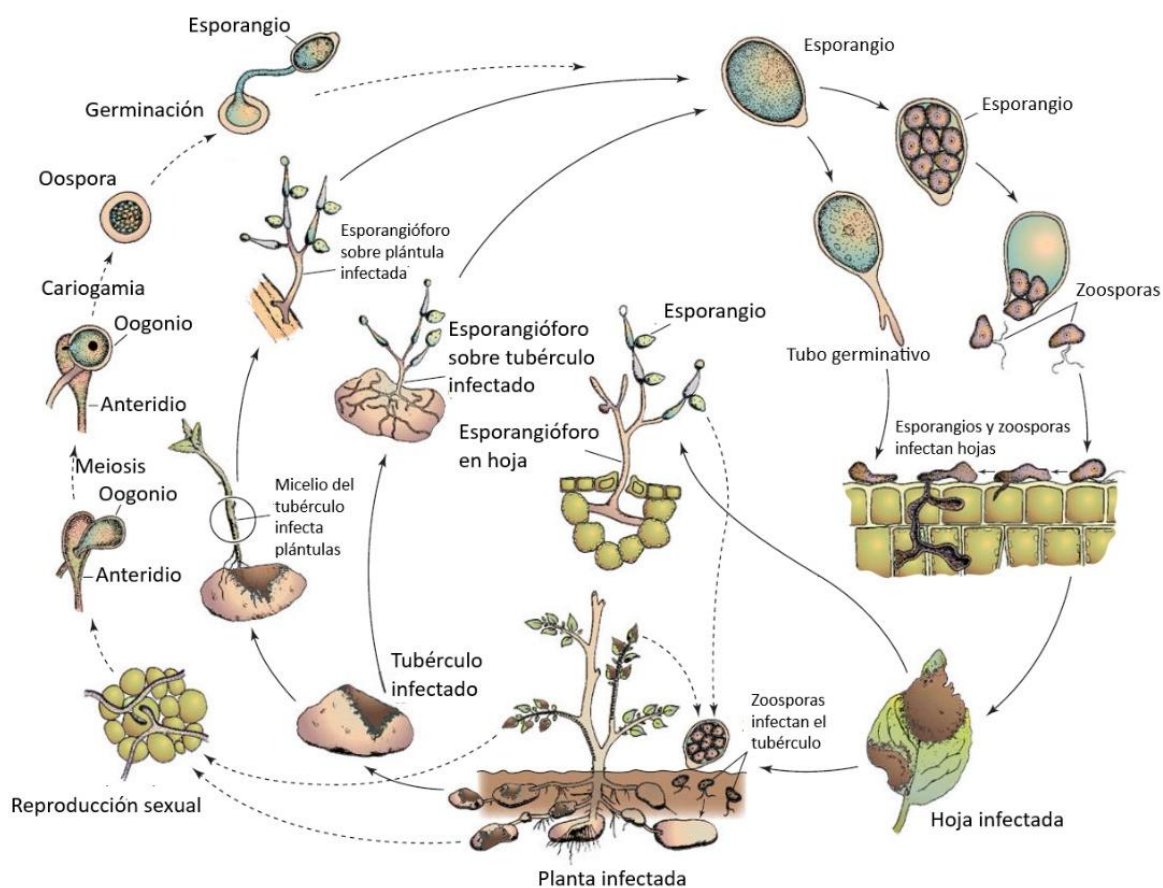


Figura 2: Ciclo de vida de *P. infestans*. En la reproducción asexual, durante la infección del tejido hospedante, se formaran numerosos esporangios que se liberan por viento o agua y se depositan sobre nuevo tejido. Los esporangios germinarán para liberar zoosporas que se moverán por el medio hasta enquistarse y comenzar la infección. Este ciclo puede cumplirse varias veces en tiempos cortos, generando reinfecciones dentro del mismo cultivo. En la reproducción sexual, se deben encontrar micelio de tipos de apareamiento compatibles para que se forme la oospora. La oospora es una estructura de resistencia y puede germinar cuando las condiciones sean adecuadas dando lugar a esporangios de reproducción asexual, que pueden germinar directamente sobre el tejido vegetal o formar zoosporas. Adaptado de (Agrios, 2005).

En regiones donde predomina la reproducción asexual, las oósporas tienen un impacto limitado en la estructura poblacional, ya que la progenie híbrida tiende a ser menos apta que sus parentales (Fry, 2008). Sin embargo, las oósporas pueden ser problemáticas desde el punto de vista agronómico al sobrevivir condiciones adversas y facilitar brotes en temporadas consecutivas (Fry, 2020). En ausencia de reproducción sexual, el micelio presente en tubérculos infectados es una de las principales formas de supervivencia del patógeno entre campañas agrícolas (Wang & Long, 2023).

Recientemente, se ha modelado el comportamiento global de *P. infestans* de la siguiente manera: en su centro de origen en México, predomina la reproducción sexual en poblaciones compuestas principalmente por individuos diploides, donde la selección natural actúa a nivel de alelos. En raras ocasiones se ha reportado la presencia de poblaciones sexuales fuera de México, existiendo reportes en Holanda (Li *et al.*, 2012) y los países nórdicos, donde poblaciones de reproducción sexual existen con cierta prevalencia y compitiendo con linajes clonales de reproducción asexual (Maurice *et al.*, 2019; Yuen & Anderson., 2012). En contraste, en la mayor parte del mundo, las poblaciones se estructuran bajo la dominancia de linajes clonales (conjunto de descendientes resultantes de un último evento de recombinación sexual), hecho favorecido por poseer una ploidía alterada, generalmente triploide, y por la falta de tipos de apareamiento compatibles (Knaus *et al.*, 2019). Este fenómeno da lugar a un escenario en el que linajes dominan áreas específicas hasta ser reemplazados por otros más aptos. La prevalencia de un linaje puede durar desde una sola temporada, como ocurrió en la epidemia de tizón tardío del tomate en 2009 en Estados Unidos, causada por el linaje US22, hasta varias décadas, como fue el caso del linaje US8 en el cultivo de papa en ese mismo país (Fry, 2020).

Genoma y adaptabilidad de *P. infestans*

Las mutaciones, migraciones, el modo de reproducción, el tamaño poblacional y las diversas presiones de selección a las que están expuestas las poblaciones de *P. infestans* son los factores que determinan su dinámica.

El genoma de *P. infestans*, de aproximadamente 240 megabases, es tres veces más grande que el de otras especies del género y contiene un 74% de regiones repetitivas ricas en AT, con elevada actividad de transposones (Haas *et al.*, 2009). Este genoma presenta una organización particular denominada "de dos velocidades" (*two-speed genome*), en la cual coexisten regiones de alta y baja densidad génica caracterizadas por distintas velocidades evolutivas (Haas *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2015). Por un lado, las regiones de alta densidad génica contienen genes esenciales relacionados con la biología del organismo (*core-orthologues*), y presentan estabilidad a nivel genómico. Por otro lado, las regiones de baja densidad génica, caracterizadas por una alta concentración de elementos repetitivos y transposones, presentan una mayor plasticidad, albergando genes que suelen encontrarse enriquecidos en la expresión *in planta*, que muestran signos de selección positiva y que han experimentado expansiones en sus familias génicas, en particular aquellos relacionados con la virulencia, como aquellos que codifican efectores (Frantzeskakis *et al.*, 2019, Wacker *et al.*, 2023). Esta característica facilita la rápida evolución del patógeno, permitiéndole adaptarse a

nuevas presiones de selección impuestas por el ambiente, los fungicidas y la resistencia de la planta hospedadora (Figura 3).

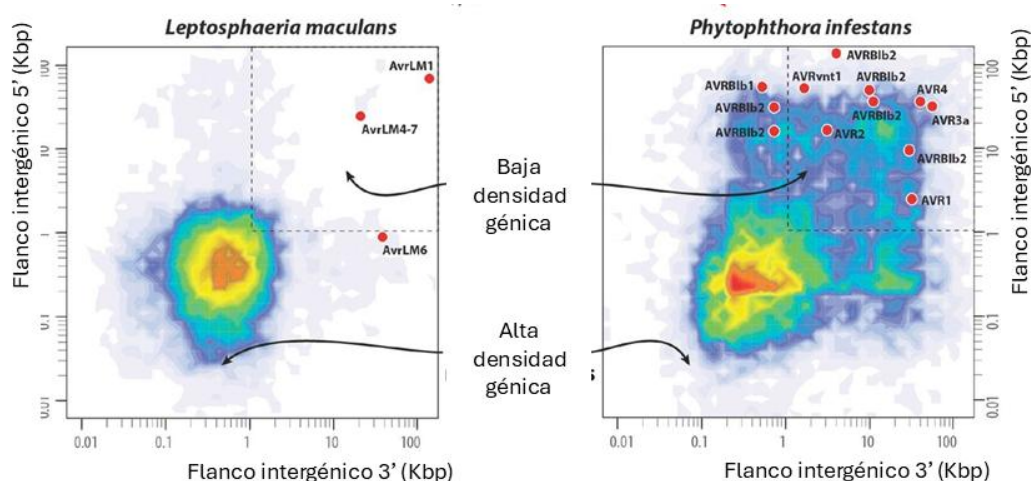


Figura 3: Distribución de genes en función de la distancia intergénica en *Leptosphaeria maculans* (izquierda) y *Phytophthora infestans* (derecha). En estos gráficos de densidad, cada punto representa un gen, ubicado según la distancia intergénica a sus flancos 3' (eje x) y 5' (eje y). El color indica la densidad de genes con esas distancias intergénicas, donde las zonas de mayor densidad aparecen en amarillo y rojo, y las de menor densidad en azul. Los genes con distancias intergénicas cortas (región inferior izquierda) se encuentran en zonas de alta densidad génica, mientras que aquellos con grandes distancias intergénicas en ambos flancos (región superior derecha) están aislados en el genoma. Los puntos rojos indican la posición de genes efectores, los cuales suelen localizarse en regiones de baja densidad génica. *L. maculans* es un hongo fitopatógeno utilizado para comparar su estructura genómica, donde la región de baja densidad génica (GSR) es menos relevante que en *P. infestans*. Adaptado de Dong *et al.*, *Genetics and Development* (2015).

Además del modelo de genoma de dos velocidades, varios estudios han documentado variación en la ploidía en *Phytophthora*. En particular, se ha reportado que los individuos provenientes de poblaciones sexuales en México son predominantemente diploides, mientras que los aislamientos de poblaciones clonales frecuentemente exhiben niveles de ploidía más altos (Figura 4) (Catal *et al.*, 2010; Knaus *et al.*, 2020). Éstas alteraciones en la ploidía (individuos triploides o tetraploides), suelen quedar de manifiesto al evaluar el balance alélico a partir de datos de secuenciación del genoma (Yoshida *et al.*, 2013). Este enfoque se basa en la frecuencia de los alelos en posiciones heterocigotas, donde una distribución cercana a 0.5 indica un organismo diploide, mientras que frecuencias alrededor de 1/3 a 2/3 sugieren triploidía.

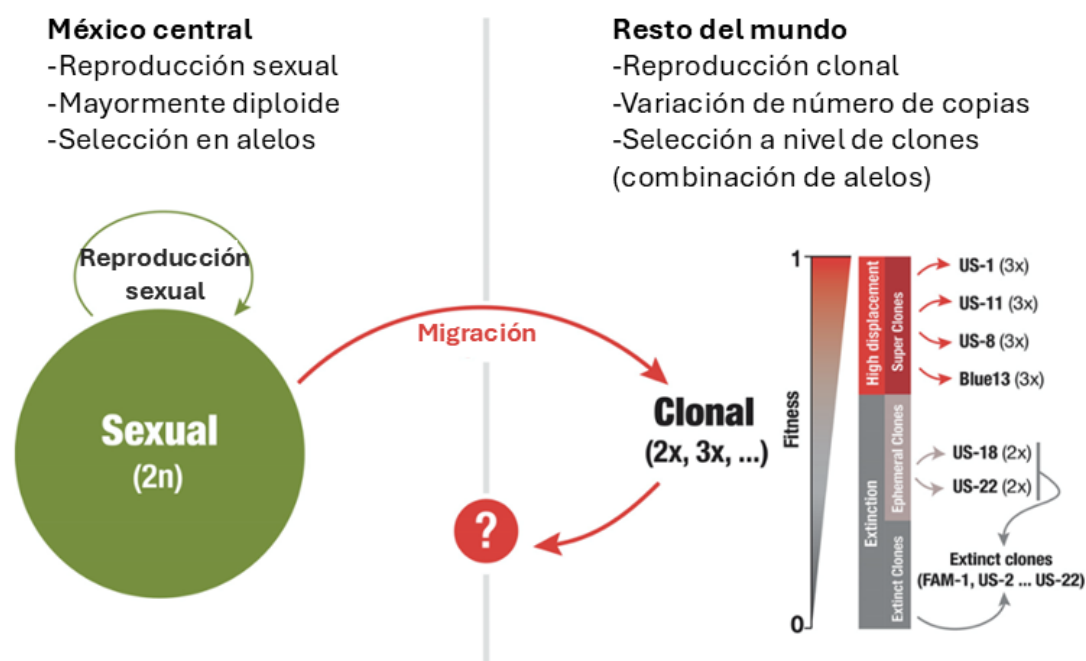


Figura 4: Modelo de los procesos genómicos asociados a la emergencia de linajes clonales de *P. infestans*. Este modelo propone que las poblaciones sexuales de *P. infestans* son predominantemente diploides, mientras que las poblaciones clonales tienden a ser triploides. Ocasionalmente, algunos clones emergen y desplazan linajes clonales previos. Los linajes clonales dominantes suelen ser triploides, incluyendo US-8, US-11, US-23 y el linaje europeo altamente agresivo EU_13_A2 (representado en nuestra muestra por 06_3928A). En contraste, otros linajes diploides, como US-18 y US-22, han mostrado una menor persistencia y pueden pasar desapercibidos en la población. Mientras que la reproducción sexual refuerza la diploidía, el estado triploide podría interferir con este proceso, aunque también conferir ventajas adaptativas que favorecen la persistencia de ciertos linajes clonales. Adaptado de Knaus *et al.*, mBio, 2022.

Este método ha sido aplicado en poblaciones de *P. infestans*, proporcionando evidencia de una predominancia de la triploidía en poblaciones clonales de Sudamérica (Knaus *et al.*, 2020). Estas observaciones también tienen respaldo en estudios que combinaron análisis de microsatélites, citometría de flujo y secuenciación masiva de 18 genomas, principalmente de los Países Bajos (Li *et al.*, 2017). Más recientemente, un estudio abarcando 57 aislamientos de distintas regiones del mundo, incluyendo representantes de poblaciones de reproducción sexual y asexual, consolidó la relación entre aneuploidía y reproducción asexual en *P. infestans*. Este trabajo también permitió inferir que la variación en el número de copias de genes (CNV, *Copy Number Variation*) no está restringida a los genes correspondientes a efectores, sino que constituye un fenómeno general del genoma. La variación en el número de copias de genes constituye otro mecanismo de generación de

variabilidad para el patógeno, influyendo en el perfil de expresión de genes particulares o en la aparición de genes parálogos (Knaus *et al.*, 2020).

Un factor muy influyente en la cantidad de mutaciones que se puedan acumular en una población es el tamaño de la misma (Jiang *et al.*, 2010). Este patógeno en las condiciones adecuadas es capaz de cumplir ciclos de vida de reproducción asexual completos en menos de cinco días, generando lesiones que exponen decenas de miles de esporangios, pudiendo incluso generar varias de estas lesiones por folíolo. Estas condiciones generan un crecimiento exponencial de la población que dan el marco para la aparición de mutaciones. Esta es una dimensión en la que la reproducción asexual cobra especial relevancia, sobre todo si el ambiente mantiene condiciones climatológicas favorables u ofrece hospedadores alternativos (MacDonald & Linde, 2002). Por otro lado, la presencia de reproducción sexual puede aumentar la diversidad genética, pero es limitada en poblaciones clonales poliploides, donde la recombinación es baja y, como se mencionó previamente, es un evento poco frecuente fuera de México Central.

El comercio internacional ha desempeñado un papel crucial en la propagación de linajes dominantes a lo largo de la historia. En el siglo XIX, el linaje FAM-1 surgió en Estados Unidos y rápidamente se dispersó, moldeando las poblaciones globales de *P. infestans* (Coomber *et al.*, 2024). Posteriormente, en el siglo XX, el linaje US-1 repitió este patrón, consolidando su presencia en numerosos países (Coomber *et al.*, 2024). Más recientemente, el linaje altamente agresivo EU_13_A2, conocido como “Blue 13” (Cooke *et al.*, 2012), emergió en el Reino Unido y ha causado graves problemas en regiones como Bangladesh (Wharton *et al.*, 2023), India (Chowdappa *et al.*, 2012) y China (Zhang *et al.*, 2021).

Otro ejemplo destacado de la capacidad de *P. infestans* para generar epidemias es el caso del linaje US-12, que resurgió en 2012 en Estados Unidos. Este linaje, previamente conocido pero considerado de baja agresividad y controlable mediante fungicidas, causó una epidemia devastadora debido a fallos en las prácticas de manejo. La infección se originó en invernaderos que producían plantines de tomate para una cadena de supermercados, los cuales fueron adquiridos por agricultores orgánicos y pequeños productores. Estos grupos, al no emplear métodos químicos de control y haber recibido material ya infectado, experimentaron pérdidas significativas en sus cultivos durante esa temporada (Fry, 2020).

Estos casos destacan la relevancia de las migraciones en la dinámica poblacional de *P. infestans*. Cuando un linaje de reproducción asexual ingresa a un nuevo entorno, compete con la población establecida para prevalecer. Las poblaciones de *P. infestans* suelen presentar períodos de dominancia de ciertos linajes, cuya duración puede variar considerablemente. Por ejemplo, el linaje US-12 tuvo una prevalencia de corta duración,

mientras que otros, como el linaje US-8 predominante en las regiones productoras del este de Estados Unidos durante las décadas de 1990 y 2000, lograron sostener su dominio por casi dos décadas (Fry, 2020).

Métodos para el estudio de poblaciones de *P. infestans*

El uso de diversos marcadores ha permitido a los científicos detectar la introducción de cepas exóticas de *P. infestans* en muchas ubicaciones en todo el mundo. Tanto los marcadores fenotípicos como los moleculares se han empleado para caracterizar las poblaciones. El tipo de apareamiento (A1 o A2) ha sido particularmente útil debido a su estabilidad, y su detección ha permitido identificar eventos clave en la estructura poblacional de *P. infestans*. En contraste, la caracterización de patotipos, basada en la virulencia sobre hospedadores diferenciadores, es menos confiable debido a su alta variabilidad y plasticidad fenotípica, lo que dificulta su uso en estudios de estructura poblacional. Por otro lado, los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados, incluyendo, en orden cronológico aproximado: alozimas (Tooley & Fry, 1983), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del genoma nuclear (RFLPs) (Goodwin *et al.*, 1994; Griffith & Shaw, 1998), diversidad en el genoma mitocondrial (Danieš *et al.*, 2014), repeticiones de secuencia simple (SSRs o microsatélites) (Li *et al.*, 2013) y genotipado por secuenciación, como GBS-RAD seq (Elshire *et al.*, 2011), secuenciación de sets de amplicones (*Amplicon Seq*) (Onda *et al.*, 2018) e incluso secuenciación de genoma completo.

Actualmente, el uso de SSRs sigue siendo el método de genotificación preferido por varias razones: i) permite realizar análisis rápidamente; ii) requiere una pequeña cantidad de ADN; iii) detecta docenas de polimorfismos dentro de poblaciones diversas; y iv) facilita la recolección de muestras mediante tarjetas FTA, que pueden ser enviadas a laboratorios especializados para su análisis. Liu *et al.* (2013) desarrollaron un set de 12 marcadores microsatélites con una metodología de análisis en paralelo, que fue adoptada globalmente por fitopatólogos. Esto dio lugar a un lenguaje común para describir poblaciones de *P. infestans* y a una amplia producción de publicaciones utilizando esta metodología. Numerosos genotipos multi locus (GML de aquí en adelante) han sido establecidos en relación a esta metodología y se han generado herramientas para trabajar con ellos con mucha rapidez. Por ejemplo, para identificar el GML al que podría pertenecer una muestra existe la herramienta <https://usablight.org/identify-ssr-genotype/> que permite la asignación en el acto. Sin embargo, nuevas técnicas están ganando relevancia, como la generación de paneles de secuenciación de amplicones o incluso de genomas completos.

Aunque el costo de secuenciación ha disminuido en los últimos años, la secuenciación de genomas completos sigue siendo costosa para estudios poblacionales con muchas muestras. Métodos como la secuenciación de amplicones y fragmentos de digestión enzimática permiten reducir la profundidad de secuenciación por muestra, lo que posibilita analizar más muestras en cada *flow cell* (Rowan *et al.*, 2017). Estas estrategias generan más sitios polimórficos que los SSRs, aunque no alcanzan la rapidez de los microsatélites. Por lo tanto, estas metodologías podrían complementarse en lugar de reemplazarse: los SSRs pueden utilizarse para caracterizaciones rápidas de la población, mientras que los paneles de amplicones o la secuenciación de genomas completos permiten investigar diferencias intra-clonales y entender variaciones claves en la patogenicidad diferencial.

El análisis de muestras de *P. infestans* mediante marcadores SSR en distintos países de Sudamérica revela escenarios diferenciados a lo largo de la región. En el noroeste, en países como Ecuador y Perú, se observa la presencia de linajes autóctonos como EC-1 y Per-1. Por el contrario, en el cono sur, un relevamiento realizado por la Dra. María Florencia Lucca a través de la red Tizón Latino señala que, en la última década, la mayoría de los aislamientos identificados en Chile, Brasil y Argentina corresponden al linaje clonal GML EU_2_A1 (Lucca *et al.*, 2011). La alta prevalencia de este linaje en el cono sur subraya la importancia de caracterizar sus rasgos fenotípicos clave desde una perspectiva epidemiológica. Esto incluye aspectos como la sensibilidad a fungicidas, las preferencias por determinados hospedantes y el repertorio de factores de virulencia, características que podrían influir en la dinámica y manejo de las epidemias en la región.

Desarrollo de las enfermedades y mecanismos de defensa en plantas

La disputa por la supervivencia entre las plantas y los microorganismos patógenos resulta en un fenómeno evolutivo espectacular. Esta interacción compleja es un reflejo de la lucha constante por los nutrientes, donde los patógenos buscan manipular el metabolismo de la planta para crear un ambiente nutricionalmente favorable, y las plantas despliegan todo su arsenal para defenderse.

Los patógenos se dividen en categorías según su estrategia para utilizar a la planta como sustrato. Los biótrofos, por ejemplo, son sutiles invasores que extraen nutrientes de los tejidos vivos de la planta, causando un daño mínimo a la pared celular del hospedante y manteniendo su viabilidad para seguir adquiriendo nutrientes (Glazebrook, 2005). Por otro lado, los necrótrofos son más destructivos, alimentándose de células muertas o dañadas. Durante la infección, liberan enzimas y toxinas que degradan las paredes celulares y maceran los tejidos del hospedante. Existen también los hemibiótrofos, patógenos versátiles que

pueden comportarse como biótrofos o necrótrofos dependiendo de la etapa de su ciclo de vida. Inicialmente mantienen vivas a las células del hospedante, pero en un punto crítico de la infección, liberan compuestos que terminan con la vida de la célula vegetal (Glazebrook, 2005).

Las plantas no son meros espectadores en esta batalla. Como seres sésiles y fotoautótrofos, enfrentan constantemente amenazas de diversos patógenos y requieren desplegar respuestas de defensa rápidas y efectivas para garantizar su supervivencia. Este sistema defensivo debe equilibrarse cuidadosamente con los procesos de crecimiento y desarrollo para maximizar la aptitud ecológica de la planta (Belkhadir *et al.*, 2014; Meldau *et al.*, 2012). En un ecosistema natural, sólo una pequeña proporción de las infecciones resulta en una planta enferma. Las plantas cuentan con defensas constitutivas, que están preformadas, y defensas inducidas, que se activan en presencia del patógeno.

Las plantas presentan una variedad de defensas preformadas, que pueden ser tanto mecánicas como bioquímicas. Las defensas mecánicas incluyen características físicas como el grosor de la epidermis, la calidad de la cutícula y la forma, tamaño y ubicación de los estomas (Reina-Pinto & Yephremov, 2009; Underwood, 2012). Por otro lado, las defensas bioquímicas preformadas son una mezcla de compuestos que incluyen péptidos y proteínas, metabolitos secundarios e inhibidores de proteasas. Estos compuestos inhibidores suelen estar almacenados en vacuolas u otras organelas en las capas celulares externas de la planta, listos para ser desplegados cuando sea necesario (Kaur *et al.*, 2022; Liao *et al.*, 2022).

Inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)

A diferencia de los animales, que poseen tanto inmunidad innata como adaptativa, las plantas dependen exclusivamente de su inmunidad innata. Este sistema inmune se divide en dos niveles principales: la inmunidad de superficie celular y la inmunidad intracelular (Boutrot & Zipfel, 2017).

La inmunidad de superficie celular está mediada por receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs) localizados en la membrana plasmática. Estos PRRs tienen la tarea de detectar patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs, por sus siglas en inglés) y patrones asociados a daño (DAMPs), entre otro tipo de patrones moleculares. Dentro de los MAMPs, destacan moléculas como lipopolisacáridos (LPS), flagelina y quitina, que en el contexto de patógenos se clasifican como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Nürnberg & Brunner, 2002). La detección de MAMPs/PAMPs por los PRRs activa

la inmunidad desencadenada por patrones (PTI, del inglés *Pattern Triggered Immunity*), que induce una reprogramación transcripcional rápida y robusta en la planta.

Dentro de las respuestas típicas de la PTI se incluyen (Bigeard *et al.*, 2015):

- Refuerzo de la pared celular mediante la deposición de callosa.
- Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).
- Acumulación de fitoalexinas.
- Acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR).
- Silenciamiento génico post-transcripcional como mecanismo de defensa antiviral.
- Activación de cascadas de señalización mediadas por proteínas MAPK y otras vías relacionadas.

Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI)

Un mecanismo utilizado por los patógenos para controlar la fisiología del hospedador a su favor es la secreción de efectores. Estas moléculas, en su mayoría proteínas pero también ARNs, desempeñan diversos roles regulatorios en los procesos del hospedador y tienen un impacto significativo en la virulencia de las cepas de *P. infestans* (Fabro, 2021). Haas y col. (2009) propusieron una clasificación principal de los efectores secretados por *P. infestans*, agrupándolos en las categorías apoplásticos e intracelulares. Entre los efectores apoplásticos proteicos, los inhibidores de glucanasas, las serin-proteasas, las proteínas pequeñas ricas en cisteína y los inhibidores de proteasas de cisteína juegan un papel crucial durante la interacción (Wang *et al.*, 2019; Boevink *et al.*, 2020; Bozkurt & Kamoun, 2020; Kamoun, 2006). Por su parte, los efectores intracelulares son numerosos y pueden clasificarse dependiendo de la presencia de motivos conservados ubicados en su región N-terminal destacándose los efectores citoplasmáticos RxLR y los de tipo Crinkler (CRN).

Las proteínas RxLR constituyen los efectores citoplasmáticos emblemáticos de los oomicetes. Deben su nombre a la presencia de un motivo amino-terminal Arg-X-Leu-Arg (donde X representa cualquier aminoácido), que define un dominio necesario para su translocación al interior de las células vegetales, seguido por dominios efectores carboxilo-terminales diversos y de rápida evolución (Haas *et al.*, 2009; Birch *et al.*, 2009; Dou *et al.*, 2008). Hasta el momento, pertenecen a este grupo todos los genes de avirulencia de oomicetes descubiertos (es decir, que codifican productos reconocidos por los hospedadores vegetales y que desencadenan la inmunidad en estos).

Los efectores CRN de *P. infestans* forman una familia compleja y ampliada de proteínas modulares asociadas a la inducción de necrosis en plantas. Contienen el dominio altamente conservado LFLAK en su región N-terminal y una gran diversidad en la región C-terminal (Haas *et al.*, 2009 Torto *et al.*, 2003; Fabro, 2021).

Las plantas pueden reconocer los efectores secretados al interior de la célula por los patógenos y montar defensas activas debido a la existencia de una línea de defensa intracelular mediada por receptores inmune conocidos como NB-LRRs o más recientemente NLRs (del inglés *Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat Receptors*). Estos receptores se caracterizan por tener un dominio de unión a nucleótidos (NB-ARC), un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR, *leucine-rich repeat*) y un dominio N-terminal adicional que puede ser del tipo CC (*coiled-coil*), TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) o, en algunos casos, RPW8 (*Resistance to Powdery Mildew 8-like*). La estructura modular de los NLR permite clasificarlos en diferentes tipos: CNL (con dominio CC), TNL (con dominio TIR), RNL (asociados a funciones auxiliares) o NL (cuando carecen de un dominio N-terminal conservado) (Hu & Chai, 2023; Maruta *et al.*, 2022).

La detección de proteínas efectoras por parte de los NLR desencadena una respuesta inmune potente y localizada, conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI, del inglés *Effector-Triggered Immunity*) (Jones *et al.*, 2016). Típicamente, la activación de la ETI resulta en una respuesta hipersensible (HR), caracterizada por la muerte celular programada en el sitio de infección para limitar la propagación del patógeno, especialmente eficaz contra patógenos biotróficos, que necesitan tejidos vivos para sobrevivir (Allen *et al.*, 2008; Herlihy *et al.*, 2019; Eitas & Dangl, 2010).

Es importante destacar que los llamados genes de resistencia (genes *R*) constituyen un subgrupo dentro de los NLR, para los cuáles se ha descrito la proteína efectora reconocida (frecuentemente denominada proteína *AVR*). Las respuestas activadas por los NLR durante la ETI suelen incluir una amplificación de las señales generadas en la PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), además de eventos únicos como la HR (Monteiro & Nishimura, 2018; Wang *et al.*, 2020).

Los receptores NLR pueden funcionar solos, o dentro de pares o redes de receptores. En estos últimos, existen NLR sensores o *sensor* (sNLR) que reconocen los efectores secretados por los patógenos directa o indirectamente, y NLR ayudantes o *helpers* (hNLR) que transducen la instancia de reconocimiento por parte de los sNLR en una señal de activación de vías de señalización río abajo que culminan en la activación de la respuesta inmune (Jones & Dangl, 2006; Mukhtar *et al.*, 2011; Bonardi *et al.*, 2011; Weßling *et al.*, 2014; Jubic *et al.*, 2019; Toghani *et al.*, 2024). Recientemente se descubrió que la activación de los

NLR durante la ETI puede involucrar la formación de complejos proteicos denominados *resistomas* (Contreras *et al.*, 2024; Kourelis *et al.*, 2021; Bi *et al.*, 2021; Ngou *et al.*, 2022) (Figura 5).

Las respuestas inmunes de las plantas, mediadas por PRR y NLR, forman una red de defensa integrada en la que PTI y ETI actúan de manera interdependiente (Yu *et al.*, 2024). La activación de NLR rara vez ocurre sin PTI, y su interacción implica una coordinación sinérgica de ROS, Ca²⁺ y fitohormonas para activar genes de defensa de manera eficiente (Figura 6). Estudios en *Arabidopsis* y tomate demuestran que PTI y ETI no operan aisladamente, sino que se potencian mutuamente, destacando la importancia de rutas comunes en la señalización de defensa (Ngou *et al.*, 2021).

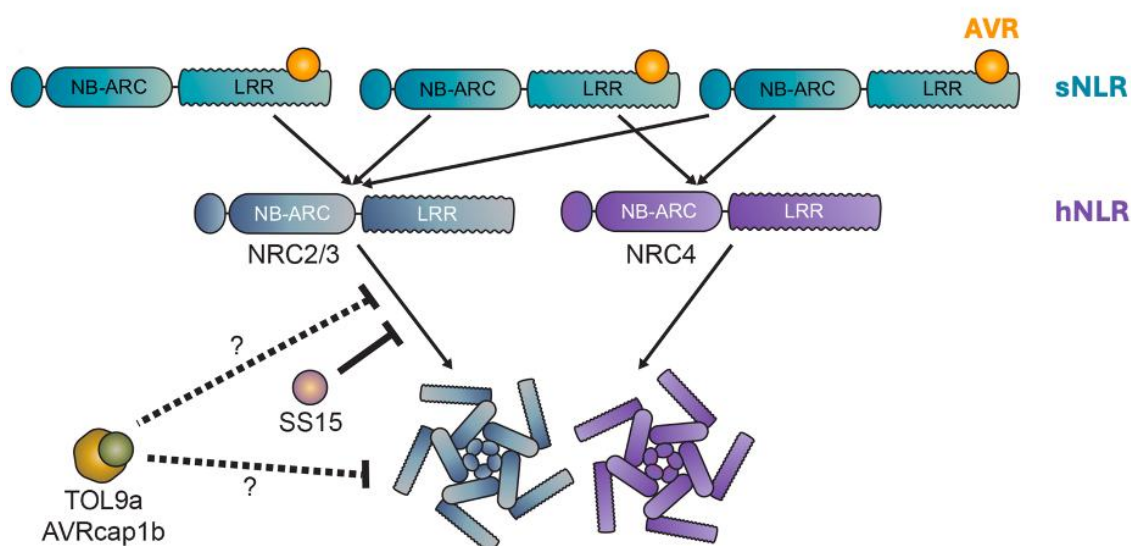


Figura 5. Modulación de redes de receptores inmunes en plantas. Los *NLR* sensores (*sNLR*) detectan efectores de manera directa o indirecta, lo que lleva a la activación de *NLR* auxiliares o *helpers* (*hNLR*). Estos últimos oligomerizan formando complejos proteicos denominados resistomas, los cuales desencadenan la respuesta inmune. La redundancia en la red inmune, como la activación alternativa a través de *NRC4*, proporciona rutas compensatorias de señalización para la defensa del hospedador. Distintas instancias de estas vías de transducción de señales pueden ser blanco de efectores que actúan de manera directa (*SS15*) o indirecta (*AVRcap1b*) sobre los componentes de la red para suprimir la respuesta inmune. Adaptado de Contreras *et al.*, Embo Press, 2023.

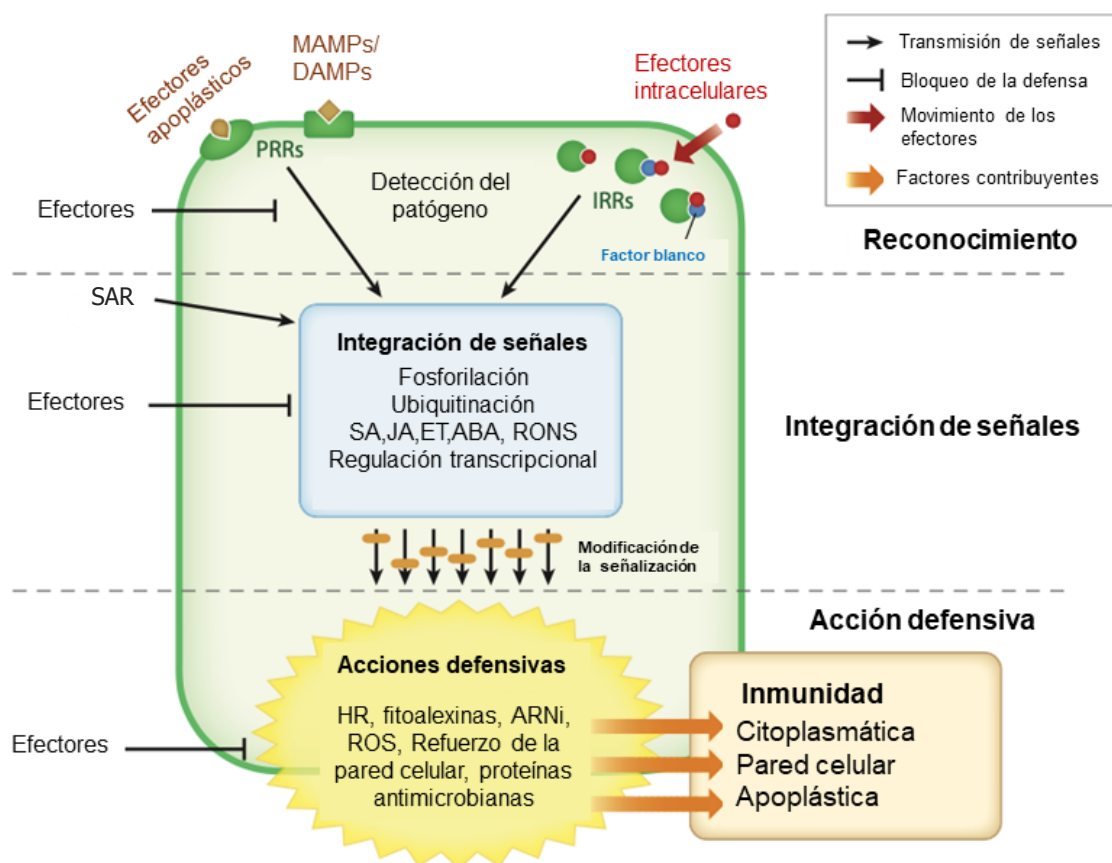


Figura 6: Eventos moleculares durante la interacción planta patógeno. El diagrama representa la integración de señales en la inmunidad de las plantas. Los efectores liberados por patógenos son detectados por receptores (PRRs: receptores de reconocimiento de patrones moleculares, e IRRs: receptores inmunes intracelulares o NLR) y la respuesta sistémica adquirida (SAR), desencadenando respuestas inmunitarias. Factores como, la ubiquitinación, balances hormonales, liberación de especies reactivas de oxígeno y procesos de fosforilación contribuyen a la integración de señales. Las modificaciones en la señalización resultantes conducen a respuestas programadas, como la muerte celular programada, reforzamiento de la pared celular y producción de proteínas antimicrobianas. Los efectores, a su vez, pueden interferir la respuesta inmune en todos estos niveles.

Medidas de control del tizón tardío en el cultivo de papa

El tizón tardío es una enfermedad policíclica cuyo desarrollo puede ser exponencial bajo condiciones favorables, representando una seria amenaza para la producción de papa. Para minimizar su impacto, es crucial adoptar estrategias integrales de manejo. Estas incluyen utilización de compuestos fitosanitarios, medidas de sanitización para reducir el inóculo inicial (eliminación de semillas infectadas, de pilas de desecho post-cosecha y de reservorios en campos vecinos), el uso de semilla certificada, la rotación con cultivos no susceptibles y el mantenimiento del espacio entre plantas, además de prácticas culturales como la cosecha en condiciones secas (Kirk, 2003; Runno-Paurson *et al.*, 2010, 2013).

La identificación de los linajes clonales y su comportamiento fenotípico no solo permite una respuesta más rápida y eficaz ante los brotes, sino que también informa las estrategias de manejo de la enfermedad adaptadas a las condiciones específicas de cada región. A modo de ejemplo, la aplicación de determinados fungicidas podría ser alentada ante la presencia de determinados linajes, pero no de otros, como es el caso de EU43, un linaje recientemente descrito en Dinamarca y que presenta resistencia al mandipropamid (Abuley *et al.*, 2023). Por otro lado, si se determina que los aislamientos responsables de un brote en papas no son agresivos en tomates, se pueden reducir las aplicaciones de fungicidas en los campos de tomate cercanos. Aunque los análisis fenotípicos pueden tardar semanas o meses, la genotipificación mediante técnicas moleculares puede asignar rápidamente las cepas a un linaje de fenotipo conocido, obteniendo resultados en solo un día (Liu *et al.*, 2012).

En regiones donde *P. infestans* sobrevive principalmente en forma de linajes clonales, las medidas de control de la enfermedad se enfocan en el uso de papa semilla libre de patógenos y en la reducción de esporangios provenientes de material vegetal infectado, como las pilas de descarte de papas y los tubérculos o semillas remanentes de la temporada anterior. En cambio, en regiones donde *P. infestans* se reproduce sexualmente de manera regular, las estrategias de manejo son más complejas dada la persistencia de oosporas en el suelo, limitando la frecuencia con la que se pueden cultivar papas en esas áreas.

El uso de fungicidas preventivos y curativos ha sido una herramienta clave en el control de *P. infestans*. Dada la alta incidencia y la severidad de la enfermedad, los agricultores utilizan compuestos fitosanitarios en forma excesiva y a veces inoportuna, aumentando el impacto ambiental y el riesgo para la salud de los operarios, el riesgo de aparición de resistencia, y los costos de producción (hasta 25 aplicaciones de compuestos por ciclo, con un promedio de 15/16 aplicaciones dependiendo de la campaña) (fontagro.org). Muchos de estos compuestos enfrentan regulaciones cada vez más rigurosas (CASAFE 2012, INTA 2018), y en consecuencia los productores de papa no dispondrán en el corto/mediano plazo de algunos de los fungicidas más utilizados, que están siendo retirados de la comercialización. Un ejemplo es el mancozeb, tratamiento de referencia utilizado en el manejo preventivo en gran parte del mundo, incluyendo Argentina (la Unión Europea desautorizó su uso recientemente, de acuerdo a la Res. G/SPS/N/EU/384, 2020).

La manera más efectiva y sustentable de lograr el control de los patógenos para reducir o incluso eliminar la aplicación de compuestos fitosanitarios, es implementar en los cultivos mecanismos de resistencia a enfermedades de base genética (Moscou y van Esse 2017; Vleeshouwers & Oliver, 2013)). Dentro de las estrategias más exploradas se incluyen las mutaciones en genes de susceptibilidad, el uso de genes *R* obtenidos de especies silvestres, la expresión de proteínas relacionadas a la defensa y el uso de estrategias de silenciamiento

génico (RNAi) (van Esse *et al.* 2020; Dong y Ronald 2019). Un desafío crucial para todas estas estrategias es que puedan conferir resistencia duradera a campo, en un contexto de rápida evolución de las poblaciones de patógenos que suele culminar en el quiebre de la resistencia introducida en el cultivo de interés.

Durante décadas, la transferencia de resistencia de base monogénica desde especies silvestres emparentadas resultó una estrategia muy útil, aunque de duración limitada en el campo al estar continuamente desafiada por la evolución de nuevas características de virulencia dentro de las poblaciones de patógenos (Cooke *et al.* 2012; Mundt 2014; Wiesner-Hanks & Nelson 2016). Apilar genes *R* en la misma variedad permite superar esta limitación, pero esta estrategia es difícil de implementar en especies altamente poliploides y/o que se reproducen principalmente por propagación clonal (como es el caso de la papa). La ingeniería genética en combinación con el descubrimiento de los mecanismos involucrados en la interacción entre microorganismos patógenos y sus hospedantes, han permitido expandir el horizonte de estrategias para obtener cultivos resistentes a diversos patógenos (Van Esse *et al.* 2020; Ghislain *et al.* 2019).

Más de 20 genes de resistencia han sido identificados en especies silvestres con resistencia al tizón tardío, incluidos los genes *RB* (Song *et al.*, 2003), *Rpi-blb2* de *Solanum bulbocastanum* (Van der Vossen *et al.*, 2003; Van der Vossen *et al.*, 2005) y *Rpi-vnt1.1* de *S. venturii* (Vleeshouwers *et al.*, 2012). El gen *RB*, también referido como *Rpi-blb1* (reconoce el efector *PITG_21388* denominado *AVRblb1*), confiere resistencia parcial en campo al tizón tardío (Van der Vossen *et al.*, 2003). También se demostró que el gen *Rpi-blb2* (reconoce al efector *AVRblb2*) confiere un alto nivel de resistencia en campo, especialmente cuando se combina con el gen *RB* (Haesaert *et al.*, 2015). El gen *Rpi-vnt1.1* (reconoce al efector *AVRvnt1.1*) confirió buen nivel de resistencia en campo excepto hacia el período de senescencia (Jones *et al.*, 2014). Ghislain y col. 2019, informaron la transferencia de los genes *RB*, *Rpi-blb2* y *Rpi-vnt1.1* individuales y combinados en dos variedades de papa. Los eventos transgénicos de papa que portaban los 3 genes *R* combinados adquirieron resistencia completa a la enfermedad del tizón tardío según los ensayos de laboratorio y de campo durante tres temporadas. Lin y col. (2023) describieron en *Solanum americanum*, tres proteínas R capaces de detectar específicamente los efectores *PITG_22825* (*AVRamr4*), *PITG_02860* (*AVRamr16*) y *PITG_04373* (*AVRamr17*). Estos hallazgos complementan estudios previos del mismo grupo que identificaron los genes de resistencia *Rpi-amr1* y *Rpi-amr3*, los cuales reconocen los efectores *PITG_07569* (*AVRamr1*) y *PITG_21190* (*AVRamr3*), respectivamente (Lin *et al.*, 2020). La activación de estas proteínas R desencadena una respuesta hipersensible que restringe la infección del patógeno. Es interesante resaltar que *Rpi-amr3* no solo reconoce un efector de *P. infestans*, sino que puede reconocer (y

desencadenar resistencia) a efectores homólogos de otras especies del género *Phytophthora*, entre ellas *P. parasítica* (responsable de la enfermedad canilla negra del tabaco) y *P. palmivora* (ocasiona la pudrición negra de la mazorca de cacao), convirtiéndolo en un gen candidato para programas de mejoramiento.

Las fuertes presiones de selección sobre las poblaciones de *P. infestans* pueden, sin embargo, llevar al desplazamiento de linajes blanco de estas estrategias por otros linajes mejor adaptados (Bradshaw *et al.*, 2004). Esta adaptabilidad se atribuye a la plasticidad genómica de *P. infestans*, lo que le permite resistir y prosperar bajo nuevas presiones dentro de sus poblaciones (Tyler *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2009, Van Esse, 2020). Se ha demostrado que la eliminación de genes de efectores blanco interrumpe la resistencia conferida por *R1*, *R2*, *R3b* y *Rpi-blb1* (Vleeshouwers *et al.*, 2011, Thilliez *et al.*, 2018). Los polimorfismos de secuencia en las proteínas *AVR* también conducen a variaciones en la virulencia. Por ejemplo, la variante del efector *AVR3a* denominada *AVR3a^{EM}* (E80/M103) puede evadir el reconocimiento por la proteína de resistencia *R3a*, y esta evasión es consecuencia de únicamente dos cambios aminoacídicos respecto a la variante reconocida (*AVR3a^{KI}*) (Armstrong *et al.*, 2005). Mutaciones de corrimiento de marco de lectura en el gen *AVR4* resultan en la pérdida de reconocimiento por *R4* en aislamientos virulentos (Waheed *et al.*, 2021).

Otro mecanismo de evasión observado en aislamientos virulentos de *P. infestans* es el silenciamiento de los genes *AVR*, como lo demuestra la regulación epigenética de *AVRvnt1* que conduce a la ruptura de la resistencia de la proteína *Rpi-vnt1.1* (Pais *et al.*, 2018). Tales polimorfismos de secuencia y expresión en efectores se observan comúnmente en poblaciones de *P. infestans* en todo el mundo.

El aumento en el número de copias de genes correspondientes a efectores, es otro mecanismo que puede favorecer la virulencia. La familia *AVRblb2*, altamente polimórfica, comprende 19 genes (Cano *et al.*, 2019), de los cuales siete habían sido inicialmente descritos como parálogos con una identidad de secuencia superior al 90% (Haas *et al.*, 2009). Se ha propuesto que la expansión de esta familia ocurrió recientemente en la evolución de *P. infestans*, ya que especies cercanas no presentan homólogos de estos genes (Oliva *et al.*, 2015). Se ha demostrado que 5 de los 7 parálogos iniciales de esta familia pueden ser reconocidos por el receptor *Rpi-blb2*, que activa una respuesta de defensa en la planta. Sin embargo, mutaciones específicas en la secuencia de estos efectores pueden llevar a la evasión del reconocimiento, como es el caso de *PITG_20301* y *PITG_20303*, los cuales presentan sustituciones de aminoácidos clave que les permiten evadir la resistencia mediada por *Rpi-blb2* (Oh *et al.*, 2009). Por su parte, la familia *AVR2* incluye 21 genes (Cano *et al.*, 2019), aunque solo tres han sido caracterizados en términos de su reconocimiento mediante

R2. Dentro de esta familia, la variante canónica PITG_08943 es idéntica a PITG_22870 y ambos son reconocidos por R2, mientras que PITG_08949 evade el reconocimiento debido a un desordenamiento intrínseco de su estructura (Yang et al., 2020).

El desarrollo de variedades resistentes que combinen productividad y defensa contra el tizón tardío puede transformar las prácticas de manejo actuales. Por lo tanto, los estudios genómicos y transcriptómicos de aislamientos locales de *P. infestans* son esenciales en el diseño de programas de mejoramiento de papa eficaces para identificar genes de resistencia adecuados para áreas específicas de producción de papa. Además, la integración con prácticas culturales adecuadas y sistemas de monitoreo de la diversidad del patógeno, será esencial para enfrentar de manera efectiva esta devastadora enfermedad.

Selección de genes blanco para el desarrollo de resistencia a *P. infestans*

Dado su papel en la interacción patógeno-hospedador y su potencial para estrategias de mejoramiento, este trabajo pone especial atención en un conjunto específico de genes efectores de *P. infestans* (Tabla 1). En particular, los efectores seleccionados incluyen aquellos que:

- Son reconocidos por receptores inmunes bien caracterizados, e incluye a *AVRblb1*, *AVRblb2*, *AVR3a*, *AVR1*, *AVR3b*, *AVRvnt1*, *AVRamr1*, *AVRamr3*, *AVRamr4*, *AVRamr16* y *AVRamr17*
- Interfieren con la señalización de redes de NLRs, como *AVRcap1b* y *PITG_15278*.
- Son candidatos para estrategias de edición génica, como los efectores EPIC, que inhiben proteasas clave en la inmunidad del hospedador.

Como describimos previamente, se han identificado linajes capaces de superar el fenotipo de resistencia conferido por distintos genes *R* utilizados en programas de mejoramiento, resaltando la necesidad de evaluar tanto la expresión de los efectores blanco como la agresividad de los linajes del patógeno en diferentes contextos agrícolas.

Gene_ID	Anotación revisada	Tipo de efector
PITG_02860	<i>AVR-amr16</i>	RXLR
PITG_04373	<i>AVR-amr17</i>	RXLR
PITG_07550	<i>AVR-smira1</i>	RXLR
PITG_07569	<i>AVR-amr1</i>	RXLR
PITG_08943	<i>AVR2</i>	RXLR
PITG_09169	<i>EPIC1</i>	ENZYME INHIBITOR
PITG_09173	<i>EPIC2B</i>	ENZYME INHIBITOR
PITG_09175	<i>EPIC2A</i>	ENZYME INHIBITOR
PITG_11484	<i>AVR10</i>	RXLR
PITG_14371	<i>AVR3a</i>	RXLR
PITG_14891	<i>EPIC3</i>	ENZYME INHIBITOR
PITG_15278	<i>PITG_15278</i>	RXLR
PITG_16294	<i>AVR-vnt1</i>	RXLR
PITG_16705	<i>AVR-cap1b</i>	RXLR
PITG_20300	<i>AVR-blb2</i>	RXLR
PITG_21190	<i>AVR-amr3</i>	RXLR
PITG_21388	<i>AVR-blb1</i>	RXLR
PITG_22825	<i>AVR-amr4</i>	RXLR
PITG_22870	<i>AVR2</i>	RXLR
PITG_16663	<i>AVR1</i>	RxLR
PITG_18215	<i>AVR3b</i>	RxLR
PITG_07558	<i>AVR-smira2</i>	RxLR
PITG_07387	<i>AVR4</i>	RxLR

Tabla 1: Efectores de *P. infestans* que serán de particular interés para este trabajo

Además de estos efectores reconocidos por proteínas R bien caracterizadas, algunos efectores desempeñan funciones clave en la modulación de la inmunidad del hospedador mediante estrategias diferentes. Por ejemplo, los efectores *AVRcap1b* y *PITG_15278* han sido identificados como supresores de la señalización río abajo de la inmunidad mediada por receptores tipo hNLR propios de Solanáceas denominados NRC (Derevnina *et al.*, 2018). La capacidad de estos efectores para interferir con la señalización mediada por NRC sugiere que su estudio podría proporcionar información fundamental sobre la estabilidad de diferentes genes de resistencia y la posibilidad de combinaciones más efectivas para estrategias de mejoramiento genético.

Por otro lado, los efectores apoplásticos también representan objetivos potenciales para mejorar la resistencia al tizón tardío en papa. En particular, los inhibidores de proteasas de la familia EPIC han sido implicados en la evasión de la inmunidad del hospedador mediante la interacción con proteasas apoplásticas del género *Solanum*. Por ejemplo, en *S. lycopersicum*, EPIC1 y EPIC2b inhiben proteasas como PIP1, RCR3 y C14, cuya actividad es fundamental en la defensa vegetal (Kaschani *et al.*, 2010). Un caso particularmente interesante es el de la proteasa RCR3 y su homólogo en *Mirabilis jalapa*, que no es reconocido por los efectores de *P. infestans* pero sí por los de *P. mirabilis*. Dong *et al.* (2014) demostraron que dos sustituciones de aminoácidos en la proteasa de *M. jalapa* determina su especificidad para la interacción con efectores. Esto sugiere que la edición génica de RCR3 en papa podría evitar su inhibición por los efectores de *P. infestans*, restaurando su función defensiva y mejorando la resistencia del cultivo.

Nicotiana benthamiana como modelo para el estudio de la interacción *P. infestans*-solanáceas

Nicotiana benthamiana, originaria de Australia y perteneciente a la familia Solanaceae, se ha convertido en un modelo valioso para estudiar diversas interacciones planta-patógeno.

N. benthamiana es especialmente susceptible a una variedad de patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y oomicetes, como *P. infestans*. Entre las ventajas que *N. benthamiana* ofrece como sistema experimental, podemos resaltar su ciclo de vida corto, la facilidad para realizar ensayos de expresión transitoria de genes y silenciamiento génico, la facilidad para propagar y mantener líneas transgénicas y la posibilidad de observar la infección con patógenos filamentosos sin necesidad de tratamiento previo, convirtiéndola en una herramienta ideal para el estudio de la patogenicidad de *P. infestans* (Figura 7).

Además, se han realizado avances significativos en la transformación genética de *N. benthamiana*, incluyendo la transformación del genoma plastídico mediante biobalística o la transformación de genoma nuclear utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter* en la actualidad).

En este trabajo utilizaremos líneas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan un set de receptores inmunes *R3a*, *R1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1* y *Rpi-amr3* capaces de reconocer las proteínas efectoras de *P. infestans* *AVR3a*, *AVR1*, *AVRblb2*, *AVRamr1* y *AVRamr3* respectivamente. Estas líneas transgénicas fueron cedidas amablemente por los grupos de los Prof. Sophien Kamoun y Jonathan Jones (The Sainsbury Lab, Norwich, Reino Unido).

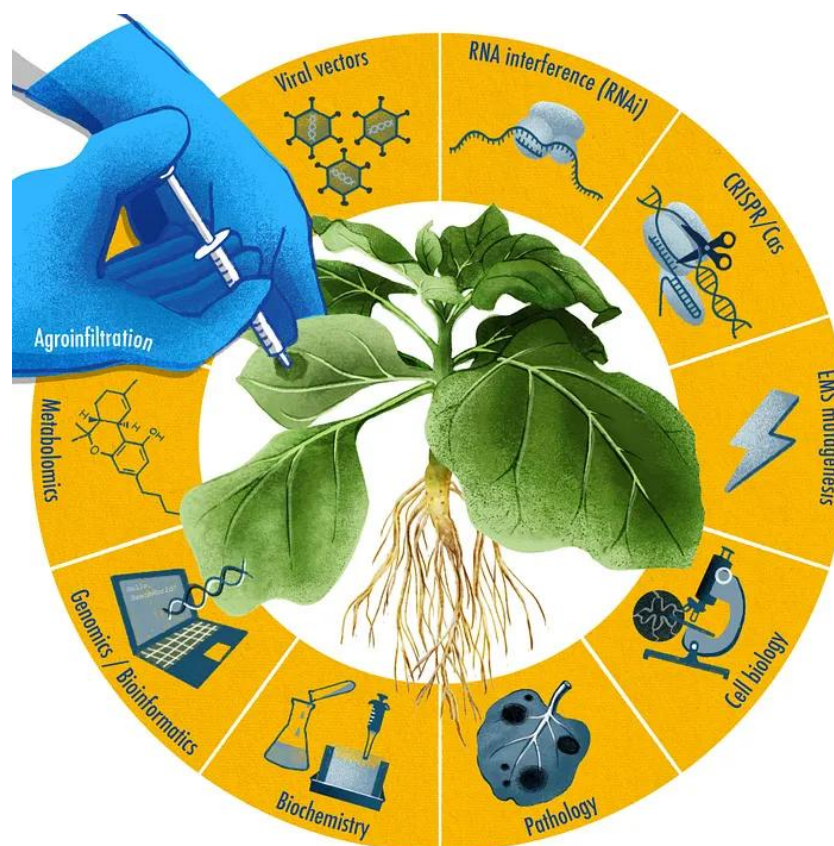


Figura 7. Aplicaciones de *Nicotiana benthamiana* en la investigación de interacción planta-patógeno y biotecnología vegetal. La imagen ilustra diversas herramientas y enfoques experimentales empleados en *N. benthamiana* como organismo modelo en estudios de patogénesis y mejoramiento vegetal. Entre las metodologías destacadas se encuentran la agroinfiltración para la expresión transitoria de genes, vectores virales para la inducción de silenciamiento génico, interferencia de ARN (RNAi), edición génica mediante CRISPR/Cas, mutagénesis dirigida por EMS, estudios de biología celular y patología vegetal. Además, se incluyen aproximaciones bioquímicas, metabolómicas, genómicas y bioinformáticas para la caracterización de respuestas de defensa e interacciones moleculares en la planta. Imagen adaptada de Derevnina *et al*, 2019.

Hipótesis y Objetivos

La población de *Phytophthora infestans* en Argentina presenta una estructura genética diferenciada, con un linaje prevalente que posee características genómicas y transcriptómicas asociadas a una mayor virulencia. La identificación de estos factores permitirá orientar el desarrollo de estrategias de resistencia al tizón tardío.

Objetivo general: Estudiar la diversidad poblacional de *Phytophthora infestans* en Argentina y caracterizar, a nivel genómico y transcriptómico, un representante de su linaje prevalente, con el fin de generar conocimiento aplicable al desarrollo de estrategias de resistencia al tizón tardío en los cultivos afectados.

Objetivos específicos:

- Evaluar las relaciones filogenéticas entre 20 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Argentina mediante un panel de 12 microsatélites (SSRs) y secuenciación de amplicones múltiples.
- Secuenciar y caracterizar el genoma de un aislamiento representativo de un linaje prevalente en la región.
- Realizar ensayos de infección en *Solanum tuberosum* var Spunta con el aislamiento representativo y caracterizar el transcriptoma del patógeno durante la infección.
- Realizar pruebas de agresividad de distintos aislamientos argentinos frente a las variedades de papa de interés comercial del país.
- Realizar pruebas de agresividad de distintos aislamientos argentinos frente a líneas de *Nicotiana benthamiana* transgénicas expresando distintas proteínas de resistencia que reconocen efectores de *P. infestans*

RESULTADOS

Capítulo I:

Caracterización genómica y poblacional de aislamientos argentinos de *Phytophthora infestans*

Obtención del aislamiento argentino de *P. infestans* PiNSL-19

Para obtener el aislamiento de *P. infestans* partimos de muestras de tubérculos infectados a campo provenientes de Candalaria, San Luis (Figura 8). Luego de desinfectar superficialmente los tubérculos, tomamos fragmentos de tubérculos del borde de la lesión y los cultivamos en placas de Petri con agar centeno suplementado con antibióticos (ampicilina y rifampicina) y antifúngicos (PCNB y Benomyl). Estas placas se guardaron a 15 grados en oscuridad. Una vez observado crecimiento de micelio a partir de estas lesiones, lo repicamos a placas frescas de agar centeno ya sin antibióticos y empezamos a crecer el nuevo aislamiento para caracterizarlo. Denominamos a este primer aislamiento PiNSL-19.

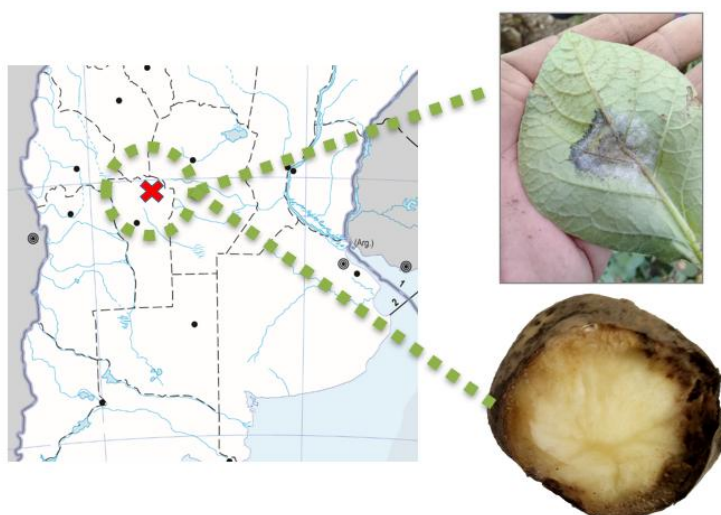


Figura 8. Obtención del aislamiento argentino de *P. infestans* PiNSL-19. En el mapa se destaca la zona de obtención del material infectado de partida, en Candalaria, Pcia. San Luis. A la derecha, material vegetal afectado por esta cepa en campo: hoja con síntomas de infección y tubérculo de papa Spunta infectado, enviado a nuestro laboratorio para la obtención del aislamiento.

La primera identificación del aislamiento se hizo por morfología de esporangios, pruebas de hospedante y asignación de especie mediante secuenciación de las regiones de espaciadores internos transcritos (ITS por *Internal Transcribed Spacer*) de genes ribosomales. Para ello, amplificamos mediante PCR las regiones ITS1 e ITS2 junto con el gen del ARN ribosomal 5,8S. Habiendo observado el tamaño esperado (960 bp) purificamos el producto de PCR, secuenciamos los productos de amplificación (secuenciación Sanger) y, una vez curada la secuencia, se verificó su identidad en bases de datos públicas. Así

confirmamos que las regiones ITS amplificadas pertenecían a la especie *P. infestans* (Figura 9).

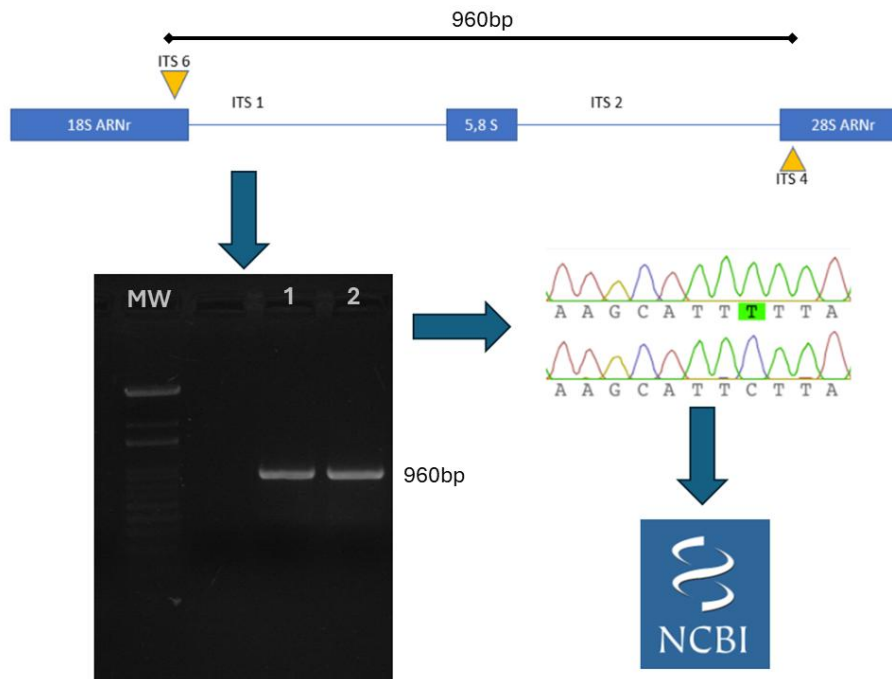


Figura 9 Identificación molecular de especie mediante el análisis de regiones ITS. Se amplificaron las regiones ITS1 e ITS2 junto con el gen del ARN ribosomal 5,8S, y los productos de amplificación se secuenciaron analizándose su secuencia por homología en bases de datos. En el gel, las calles 1 y 2 son productos de PCR de las regiones ITS de PINSL-19. La calle MW tiene un Ladder de 100pb. El producto de PCR esperado es de 960 pb.

Posteriormente, realizamos pruebas de patogenicidad sobre folíolos de papa de la variedad Spunta, misma variedad sobre la que se había encontrado a campo, hojas de *Solanum lycopersicum* y hojas de *N. benthamiana*. Pudimos observar que todos los hospedantes eran susceptibles, pudiendo re-aislar *P. infestans* a partir del material infectado (Figura 10).

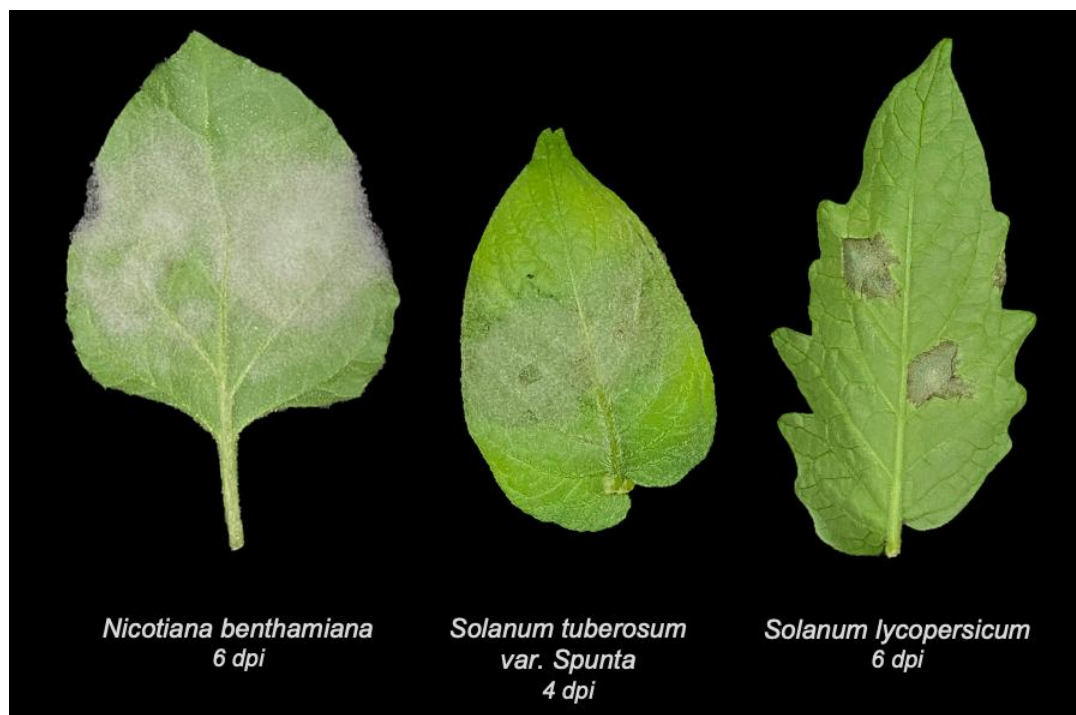


Figura 10. Pruebas de patogenicidad en distintos hospedantes. Se inocularon hojas de *N. benthamiana* (izquierda), *S. tuberosum* (centro) y *S. lycopersicum* (derecha) con *P. infestans* PiNSL-19. Las fotografías fueron tomadas 6 días post inoculación en tomate y *N. benthamiana* y 4 días post inoculación en papa.

Diversidad genética de *P. infestans* en Argentina: Análisis de aislamientos de distintas regiones productoras

A partir de una colaboración con la Dra. María Florencia Lucca (INTA- EEA Balcarce; Red Tizón Latino) obtuvimos tejido foliar de plantas de papas infectadas de diversas regiones productoras del país. Todas estas muestras fueron obtenidas en las campañas de 2020 y 2021. Re-aislamos *P. infestans* a partir de estas muestras utilizando la misma metodología descrita para PiNSL-19 generando una colección de 20 aislamientos, conservando micelio (crecido en placa RSA) en nitrógeno líquido. Una vez establecida la colección, extrajimos ADN de cada uno de estos aislamientos para ser analizados mediante un panel de 12 microsatélites (SSR) (Li *et al.*, 2012), y un panel de 98 blancos moleculares por secuenciación de amplicones. Las muestras nuevas provienen principalmente del Sudeste de la Provincia de Buenos Aires, principal región productora de papas del país con 17 aislamientos. Las muestras restantes provienen de las Provincias de Córdoba y Tucumán (Figura 11).

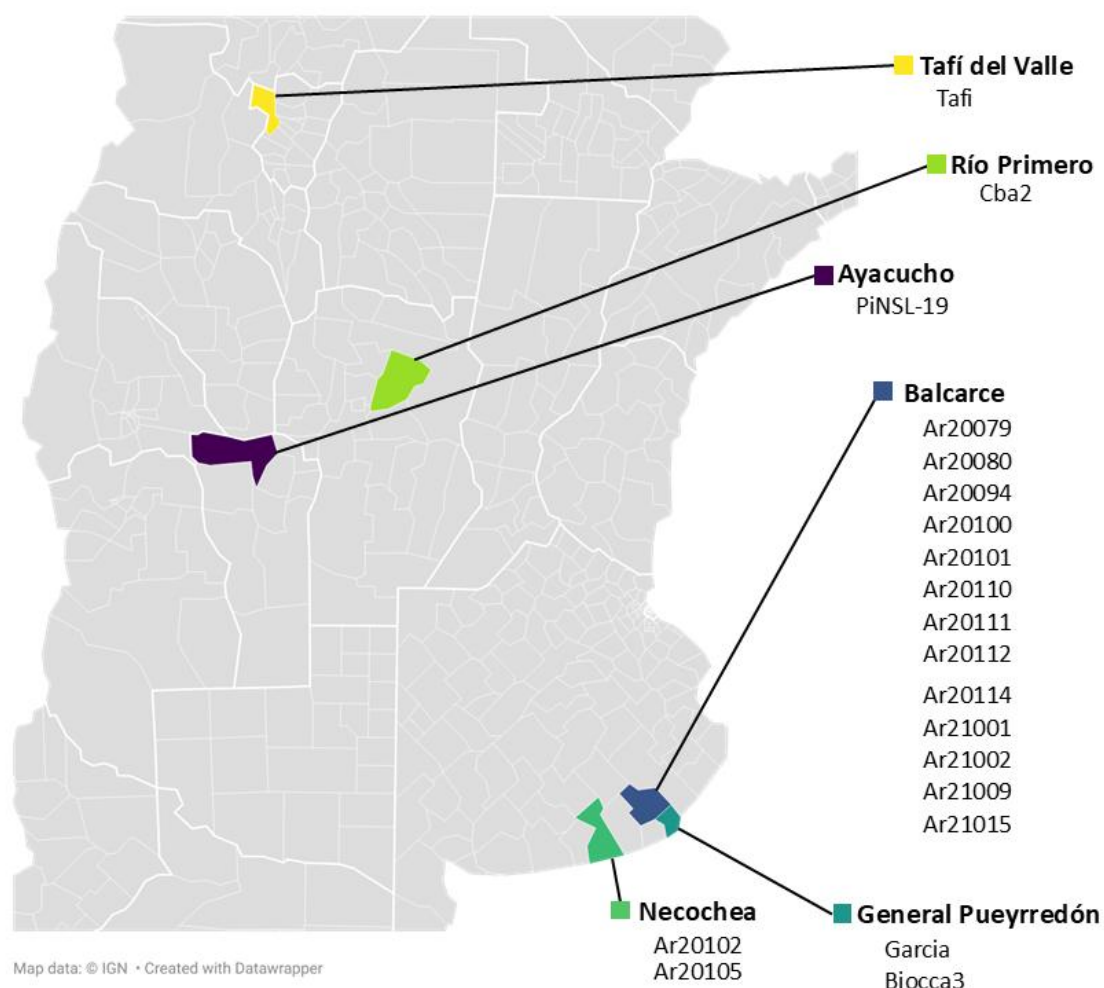


Figura 11: Origen de los aislamientos argentinos. El mapa destaca las localidades de Balcarce, General Pueyrredón (Mar del Plata), Necochea (Quequén), Ayacucho (Candelaria), Río Primero (Montecristo) y Tafí del valle de donde provienen los aislamientos listados bajo el nombre de cada partido. Mapa creado con Datawrapper.

Genotipificación de aislamientos de *P. infestans* mediante marcadores moleculares tipo SSR

Los datos de SSR obtenidos para cada muestra fueron analizados utilizando la plataforma en línea USBlight (<https://usablight.org/identify-ssr-genotype>) para identificar el genotipo correspondiente a cada perfil de SSR. Todas las muestras analizadas fueron asignadas al genotipo EU_2_A1, un linaje clonal previamente reportado en Europa y asociado a características epidemiológicas específicas. Aunque los índices de diversidad genética generales sugirieron una diversidad moderada dentro del conjunto de datos ($H_{exp} = 0.35$), un árbol *Neighbour-Joining* basado en las distancias de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004) reveló un alto grado de similitud entre las muestras, con varias siendo genéticamente idénticas en todos los loci. Esta discrepancia probablemente refleja la naturaleza clonal del linaje EU_2_A1 que

domina el conjunto de muestras, así como la limitada capacidad informativa de ciertos *loci* (como aquellos con baja riqueza alélica o patrones monomórficos para esta población) (Tabla 2). Estos resultados ponen de manifiesto la estructura clonal de la población y sugieren que si bien los SSR fueron útiles para asignar las muestras al GML *EU_2_A1*, la capacidad de este panel para detectar variabilidad dentro de la población fue limitada. Dado esto, en la siguiente sección exploramos la diversidad genética de los aislamientos argentinos a partir de un panel de *Secuenciación de amplicones*, con un mayor número de marcadores SNPs distribuidos en diferentes regiones del genoma.

locus	alelos	1-D	Hexp	Evenness
D13	1	.	.	
PinfSSR8	5	0.688	0.699	0.909
PinfSSR4	3	0.524	0.537	0.910
Pi04	3	0.524	0.537	0.910
Pi70	1	.	.	
PinfSSR6	3	0.667	0.678	1.000
Pi63	2	0.500	0.513	1.000
PiG11	2	0.500	0.513	1.000
Pi02	1	.	.	
PinfSSR11	4	0.677	0.689	0.951
PinfSSR2	2	0.049	0.050	0.413
Pi4B	3	0.667	0.678	1.000

Tabla 2: Diversidad genética en 12 loci SSR. Se presentan el número de alelos, el índice de dominancia de Simpson (1-D), la heterocigosidad esperada (Hexp) y la uniformidad de frecuencias alélicas (Evenness). Los loci monomórficos carecen de índices de diversidad.

Análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en aislamientos de *P. infestans* mediante secuenciación de amplicones

En el marco de una colaboración con el Dr. David Cooke (James Hutton Institute, Dundee, Escocia), el Prof. Kurt Lamour (University of Tennessee, EEUU), y el Dr. Ian Kreuze (Centro Internacional de la Papa, Perú), nos propusimos evaluar la estrategia de secuenciación de amplicones múltiples para caracterizar los aislamientos de *P. infestans* obtenidos. Para ello, el consorcio decidió utilizar un set de 98 SNPs correspondientes a 98 genes distintos, seleccionados por el Prof. Sophien Kamoun (TSL, Reino Unido) (ver tabla Suplementaria 2). Los oligonucleótidos o *primers* fueron diseñados para amplificar 180pb conteniendo el SNP blanco central. Todos los SNPs adicionales detectados dentro de los

amplicones secuenciados fueron considerados para los análisis posteriores. Enviamos muestras de ADN de nuestros aislamientos al Prof. Lamour, a cargo de la empresa MonsterPlex (floodlightgenomics.com). Junto con nuestras muestras, se incluyeron 18 aislamientos adicionales proporcionados por el Dr. Cooke. Nos resultaba de particular interés utilizar estos aislamientos, ya que entre ellos había seis aislamientos caracterizados mediante SSR como GML EU_2_A1, igual que todas las muestras argentinas. También su set incluyó cinco aislamientos pertenecientes al GML EU_8_A1 y siete aislamientos identificados como GML EU_13_A2. Incluir estas muestras en un análisis filogenético con las muestras argentinas nos permitiría obtener información sobre: 1) ¿cómo se estructura una filogenia obtenida por matrices de distancia de marcadores SNPs en relación con el genotipo descrito mediante SSRs? 2) ¿cómo se estructuran los aislamientos argentinos respecto de otras muestras del mismo GML pero obtenidas en otras partes del mundo? En la Tabla 3 se detallan las muestras analizadas por secuenciación de amplicones.

Con el objetivo de generar un set de datos que nos permita comparar las muestras Argentinas y Europeas de *P. infestans* en función de la conservación de SNPs entre ellas, generamos un archivo tipo FASTA de “genoma reducido” de la cepa de referencia de *P. infestans* denominada T30-4 (Haas *et al.*, 2009). Este genoma reducido incluye sólo los 98 fragmentos de los amplicones, extendiendo 50 pb a cada lado del amplicón de 180 pb. Esto terminó generando un archivo FASTA de referencia de 98 “contigs” de 280 pb de largo. Este genoma reducido fue utilizado para alinear las 38 muestras de *P. infestans* en formato FASTQ y estos alineamientos se utilizaron para generar un archivo de *variant calling format* (vcf) que incluyera todas las muestras. Una vez obtenido este set de datos, lo analizamos en R utilizando los paquetes poppr, vcfR y la función *aboot*. Estos scripts se encuentran detallados en la sección Materiales y Métodos y en el GitHub del laboratorio del Prof. Niklaus Grunwald, donde fueron desarrollados (<https://github.com/grunwaldlab/poppr>). El árbol filogenético obtenido a partir del análisis de secuenciación de amplicones (Figura 12) muestra que los aislamientos analizados se agrupan en función de su genotipo multilocus (GML), formando ramas bien definidas para cada GML. Esto indica que los SNPs seleccionados permiten diferenciar los distintos linajes de *P. infestans* de manera consistente con los resultados obtenidos mediante los marcadores SSR. En otras palabras, tanto el análisis de SSRs como el de secuenciación de amplicones reflejan la misma estructura poblacional, lo que refuerza la validez de ambos enfoques para caracterizar genéticamente los aislamientos.

Nombre	Año	Hospedador	Localidad	Genotipo (SSR)
Ar20079	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20080	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20094	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20100	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20101	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20102	2020	<i>S. tuberosum</i>	Quequén (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20105	2020	<i>S. tuberosum</i>	Quequén (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20110	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20111	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20112	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar20114	2020	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar21001	2021	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar21002	2021	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar21009	2021	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Ar21015	2021	<i>S. tuberosum</i>	Balcarce (Bs.As)	EU_2_A1
Cba2	2021	<i>S. tuberosum</i>	Montecristo (Córdoba)	EU_2_A1
Tafi	2021	<i>S. tuberosum</i>	Tafí del Valle (Tucuman)	EU_2_A1
García	2021	<i>S. tuberosum</i>	General Pueyrredon (Bs.As.)	EU_2_A1
Biocca	2021	<i>S. tuberosum</i>	General Pueyrredon (Bs.As.)	EU_2_A1
PiNSL-19	2019	<i>S. tuberosum</i>	Candelaria (San Luis)	EU_2_A1
06 3964A	2006	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
14T3A	2014	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
08 6942A	2008	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
08 7054C	2008	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
08 6946A	2008	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
06 4132B	2006	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
08 6946B	2008	s/d	Reino Unido	EU_13_A2
97 346 02	1997	s/d	Reino Unido	EU_8_A1
14LD1B	2014	s/d	Reino Unido	EU_8_A1
97 345 05	1997	s/d	Reino Unido	EU_8_A1
06 4168C	2006	s/d	Reino Unido	EU_8_A1
06 4168B	2006	s/d	Reino Unido	EU_8_A1
95 197	1995	s/d	Reino Unido	EU_2_A1
96 145 1	1996	s/d	Reino Unido	EU_2_A1
98 142 08	1998	s/d	Reino Unido	EU_2_A1
97 253 05	1997	s/d	Reino Unido	EU_2_A1
96 145 7	1996	s/d	Reino Unido	EU_2_A1
97 310 07	1997	s/d	Reino Unido	EU_2_A1

Tabla 3: Aislamientos de *P. infestans* utilizados en este trabajo.

Por otro lado, es importante destacar que dentro de la rama que incluye a los aislamientos del GML EU_2_A1, todos los aislamientos argentinos se agrupan y con distancias menores entre cualquiera de ellos que en relación con cualquier otro aislamiento EU_2_A1. Esto podría indicar que además de ser alta la prevalencia de EU_2_A1 en Argentina, como se ha descrito para el cono sur de Sudamérica, las muestras argentinas no parecen derivar de múltiples eventos de migración, sino de un ancestro común, incluso dentro de este GML.

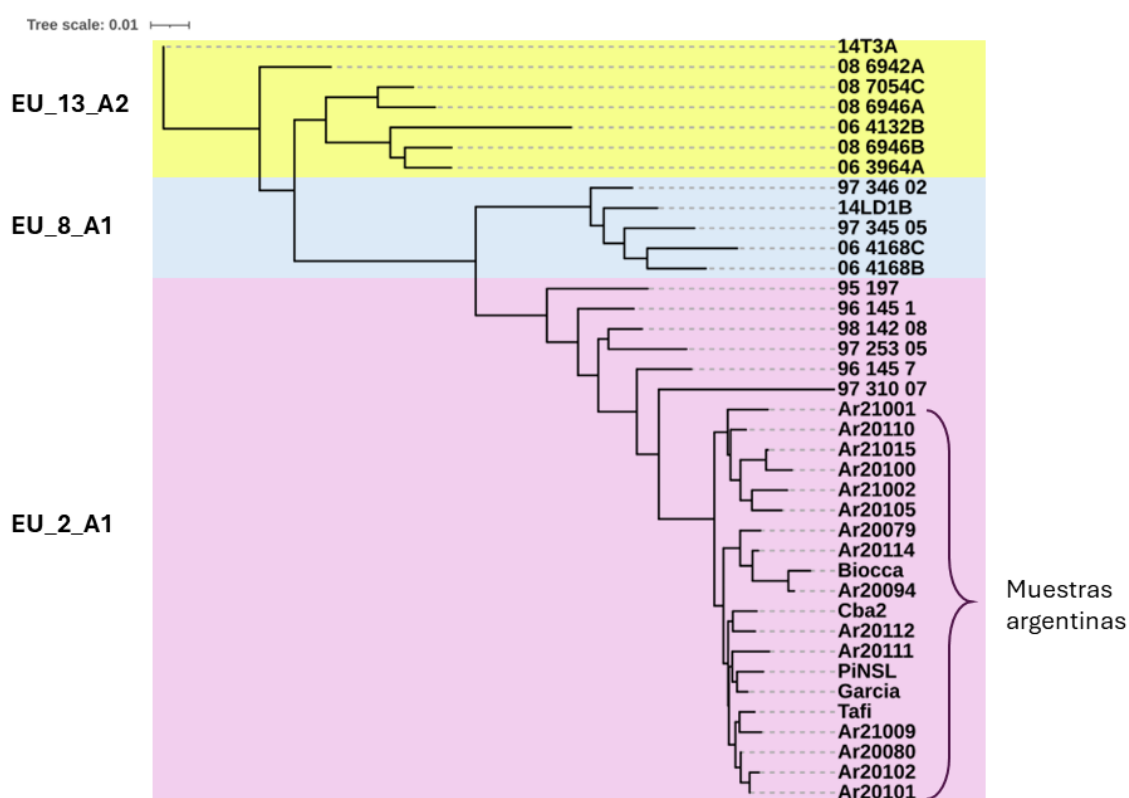
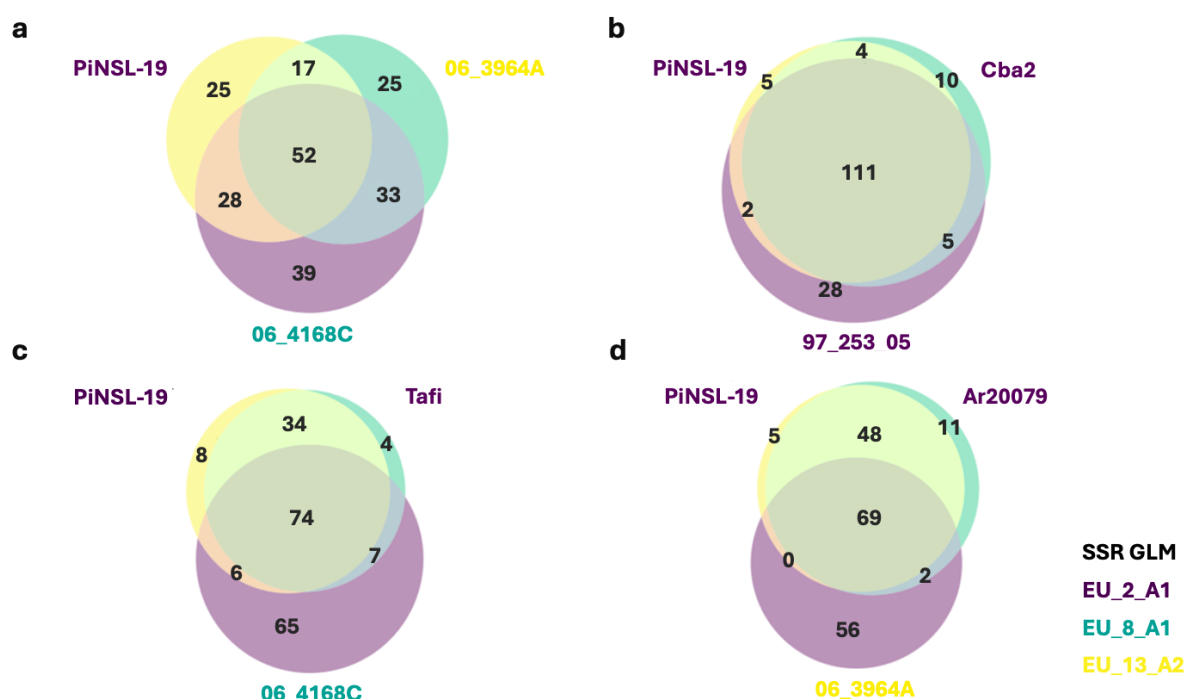


Figura 12. Árbol filogenético de aislamientos de *P. infestans* Árbol de tipo *Neighbour-Joining* basado en distancias de Bruvo, construido a partir de datos de *Secuenciación de amplicones*. Se muestran los aislamientos organizados según su genotipo multilocus (GML), con cada grupo resaltado en diferentes colores: EU_2_A1 (fondo rosa), EU_8_A1 (fondo azul) y EU_13_A2 (fondo amarillo). Los aislamientos argentinos se agrupan dentro del clado EU_2_A1, mientras que los otros aislamientos corresponden a referencias internacionales.

Con el objetivo de identificar diferencias entre los aislamientos argentinos de *P. infestans*, analizamos la distribución de SNPs dentro y entre los distintos GMLs. Para ello, extrajimos la información de genotipo (columna GT) del archivo VCF generado a partir del análisis de secuenciación de amplicones, y construimos una matriz binaria donde cada posición variante fue codificada según su estado genotípico:

- **0**: Homocigota para el alelo de referencia T30-4 (0/0).
- **1**: Heterocigota (0/1).
- **2**: Homocigota para el alelo alternativo (1/1).

Esta transformación nos permitió comparar la presencia y distribución de SNPs entre aislamientos y evaluar qué variantes eran compartidas o exclusivas de cada grupo. Para visualizar estas relaciones, generamos diagramas de Venn (Figura 13), los cuales muestran el número de SNPs compartidos entre distintas combinaciones de aislamientos pertenecientes a los GMLs *EU_2_A1*, *EU_8_A1* y *EU_13_A2*.



Los resultados mostraron que dentro de un mismo GML, los aislamientos argentinos comparten la mayoría de los SNPs, lo que indica una baja diversidad genética dentro de este grupo (Figura 13b). Sin embargo, al comparar aislamientos de diferentes GMLs, se observa

una mayor diferenciación en los SNPs compartidos, reflejando la divergencia entre estos linajes genéticos (Figuras 13a, 13c y 13d). Estos patrones sugieren que la población argentina de *P. infestans* pertenece a un linaje clonal dominante (*EU_2_A1*), con baja variabilidad interna pero claramente distinguible de otros GMLs.

Caracterización genómica del aislamiento PiNSL-19

La secuenciación del genoma completo (*WGS*, por sus siglas en inglés) es una herramienta que permite la caracterización integral del material genético de un organismo, proporcionando información detallada sobre variantes genéticas, estructura genómica y posibles implicaciones funcionales.

A partir de ADN genómico extraído de micelio crecido en placa RSA, se secuenció el genoma de PiNSL-19 utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2000 (servicio provisto por Novogene), logrando una cobertura del genoma de 50x. Las lecturas de secuenciación de PiNSL-19 se alinearon con el genoma de referencia T30-4 (Haas *et al.*, 2009), cubriendo el 97.35% del genoma. A partir de estos datos, se realizaron los siguientes análisis:

- Inferencia de ploidía: Se estimó la ploidía del aislamiento mediante la distribución de frecuencias alélicas en sitios heterocigotas.
- Detección de variaciones en número de copias (CNV por *Copy Number Variation*): Se identificaron regiones del genoma con incremento en el número de copias.
- Genes sin cobertura en el alineamiento: Se analizaron regiones del genoma sin cobertura respecto a T30-4.
- Comparación con otros genomas de *P. infestans*: Se evaluó la similitud del genoma de PiNSL-19 con aislamientos previamente secuenciados para establecer relaciones de parentesco.

Ploidía del aislamiento PiNSL-19

Para explorar la estructura genómica de PiNSL-19, analizamos las distribuciones de frecuencia de alelos utilizando los SNPs derivados del genoma completo. Este análisis se basa en determinar posiciones variantes en heterocigosis. La proporción de lecturas que sostienen la presencia de un alelo A o B puede estar en torno al 0.5 (mitad de lecturas que apoyan uno u otro alelo), como podría esperarse en un organismo diploide. En cambio, la proporción de lecturas de 1/3 a 2/3 supondría una estructura triploide de este genoma. Los gráficos de histograma de las distribuciones de frecuencia de alelos heterocigota reflejan estos

patrones distintivos relacionados con su nivel de ploidía. En el caso de PiNSL-19, el análisis reveló una distribución bimodal, respaldando una arquitectura genómica triploide (Figura 14), compatible con reportes que describen una prevalencia elevada de triploidización en las poblaciones de *P. infestans* de Sudamérica (Knaus et al., 2020).

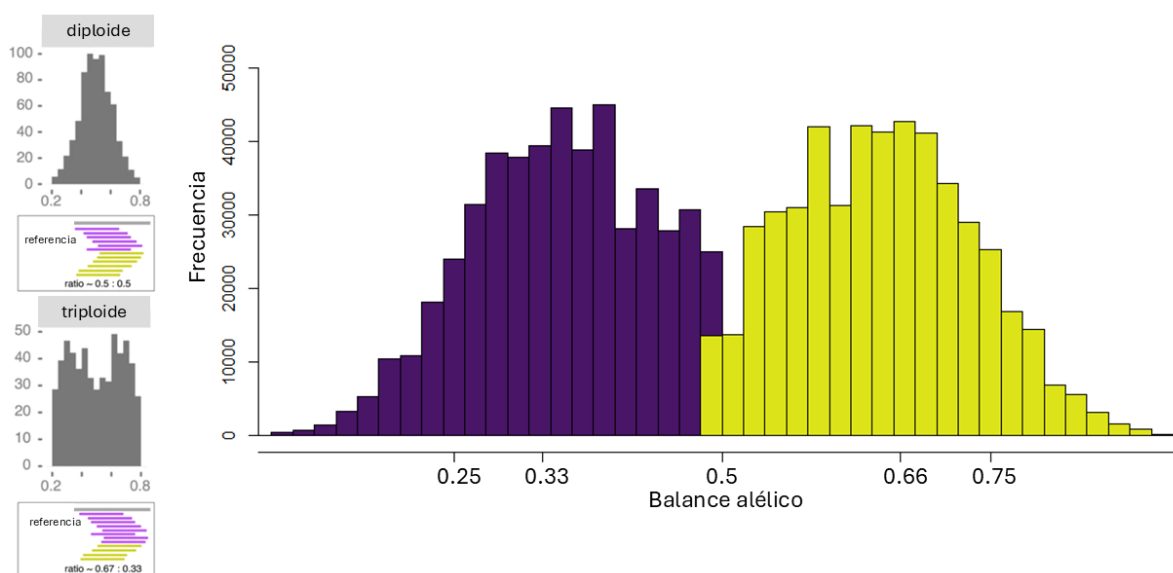


Figura 14 Distribución de frecuencias alélicas en SNPs heterocigotas de *P. infestans* PiNSL-19. Histograma mostrando la proporción de alelos en posiciones heterocigotas dentro del genoma de *PiNSL-19*. Los alelos mayoritarios se representan en amarillo y los alelos minoritarios en violeta.

Número de copias de genes en el genoma de PiNSL-19

La estimación del número de copias de genes en *P. infestans* requiere considerar las limitaciones de la secuenciación por Illumina. Debido a la corta longitud de lectura (150 pb), la identificación precisa de regiones repetitivas es dificultosa. Además, el sesgo hacia regiones con alto contenido de GC puede afectar la cobertura, influyendo en la inferencia de la presencia o ausencia de genes. Por ejemplo, una cobertura excesiva podría sobrestimar el número de copias.

Para lograr una estimación más robusta del número de copias, analizamos la profundidad de secuenciación para cada posición del genoma de PiNSL-19 usando el programa samtools mpileup. La estimación de la profundidad de secuenciación por gen corregida por GC fue calculada siguiendo a Raffaele y col., 2010:

$$\hat{ARD}(g) = ARD(g) * mARD / mARD_{GC}$$

Aquí, $ARD(g)$ es la profundidad media de secuenciación para un gen dado, $mARD$ es la cobertura media de todos los genes y $mARD_{GC}$ es la cobertura media para los genes que compartan el mismo percentil GC que el gen analizado. Este cálculo resulta en la profundidad media de secuenciación ajustada por GC para el gen en particular. En este sentido, sólo incluimos aquellos genes que tuvieran un $ARD(g)$ superior al 25% de la cobertura media del genoma (12x). Esto significa que aquellos genes con cobertura ajustada por contenido GC menor a 12 se removieron para evitar errores en la asignación del número de copias por escasa profundidad de secuenciación (Knaus *et al.*, 2020).

El análisis del número de copias de genes en PiNSL-19 mostró que la mayoría de los genes presentan triploidía. No encontramos una correlación directa entre los genes de efectores, que suelen ubicarse en regiones de baja densidad génica, y una mayor proporción de copias triplicadas. Este resultado coincide con lo reportado por Knaus *et al.* (2020), quienes tampoco observaron dicha correlación en su análisis de genomas de *P. infestans* provenientes de diversas regiones del mundo. Esto sugiere que la expansión de la ploidía en PiNSL-19 no está restringida a regiones con alta actividad de transposones o secuencias repetitivas, sino que afecta al genoma en su conjunto.

Como se observa en la Figura 15, los genes correspondientes a efectores RxLR (promedio = 2.97; desvío estándar = 0.511) y efectores apoplásticos (promedio = 3.03; desvío estándar = 0.545) se encuentran mayormente en tres copias. En cambio, los efectores Crinkler presentaron un menor número de copias en promedio (media = 2.7; desvío estándar = 0.823). Como control, utilizamos genes de la familia de las ubiquitinas, una categoría funcional no relacionada con la virulencia y ubicada en regiones de alta densidad génica. En este grupo, observamos una tendencia más marcada hacia la triploidización (media = 3.12; desvío estándar = 0.463), con menos variabilidad en el número de copias en comparación con los efectores.

El promedio general del número de copias en la anotación completa del genoma de PiNSL-19 fue de 3.04 (desvío estándar = 0.478). A pesar de esto, es importante destacar que las ubiquitinas mostraron una mayor consistencia en mantener tres copias, con pocos genes en categorías de 2, 4 o 5 copias. Para obtener una comprensión más precisa de este fenómeno, sería valioso complementar este análisis con otros estudios enfocados en la estructura del genoma y la dinámica de la ploidía en *P. infestans*.

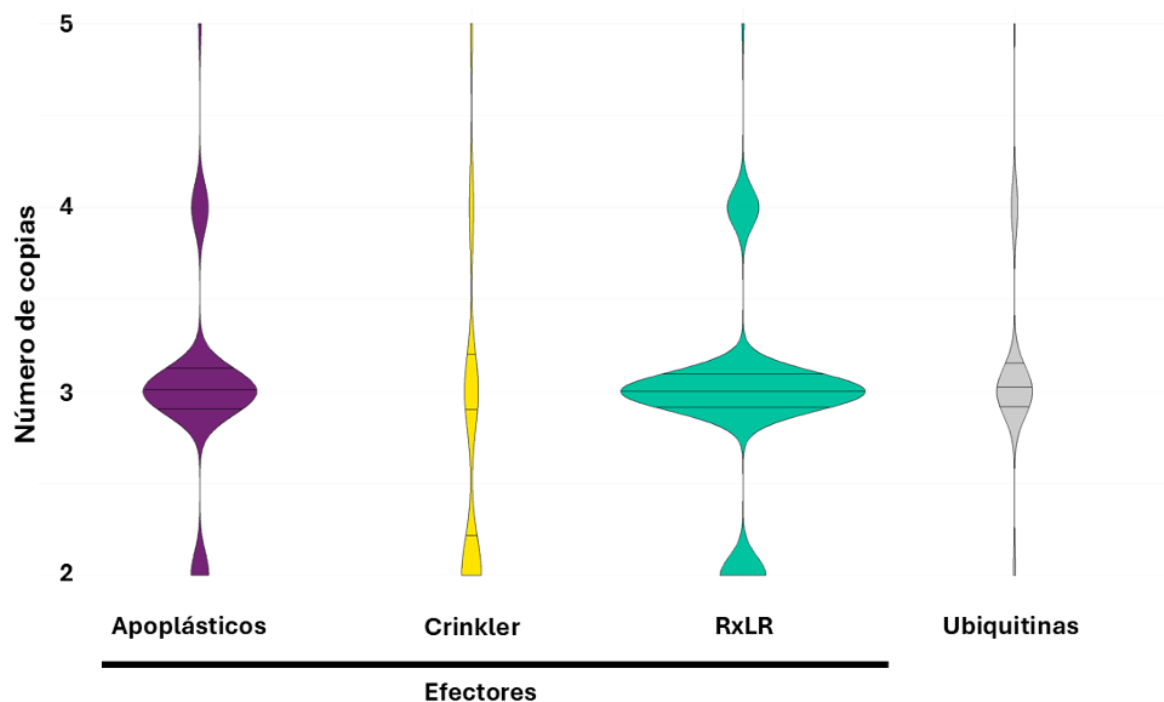


Figura 15. Distribución del número de copias de genes en PiNSL-19. Gráfico tipo *violin plot* mostrando la distribución de genes presentes en dos, tres o cuatro copias en *P. infestans* PiNSL-19, estimada a partir de la cobertura de secuenciación corregida por contenido GC. Se presentan diferentes categorías de genes: efectores apoplásticos (violeta), efectores Crinkler (amarillo), efectores RxLR (verde) y ubiquitinas como genes no efectores (gris). El área de los violines está ajustada al número de genes. Se muestra en cada violín los percentiles 0.25, 0.5 y 0.75 como líneas horizontales.

Deleción génica y su impacto en el repertorio de efectores de PiNSL-19

El análisis de pérdida de genes en genomas de patógenos es una herramienta clave para comprender los mecanismos de adaptación, evolución y especialización de estos organismos. La ausencia de ciertos genes puede influir en la virulencia, la evasión de la inmunidad del hospedador y la plasticidad del genoma en respuesta a presiones selectivas. En el caso de *P. infestans*, la deleción de genes que codifican efectores puede tener un impacto directo en su interacción con el hospedante y en su capacidad de infección.

Para identificar genes ausentes en PiNSL-19, evaluamos aquellos cuya cobertura de secuenciación fue nula a lo largo de toda su longitud en comparación con el genoma de referencia T30-4. Mediante este criterio, detectamos un total de 82 genes ausentes en PiNSL-19, entre los cuales se incluyen 16 correspondientes a efectores RxLR y 5 correspondientes a efectores apoplásticos (Figura 16).

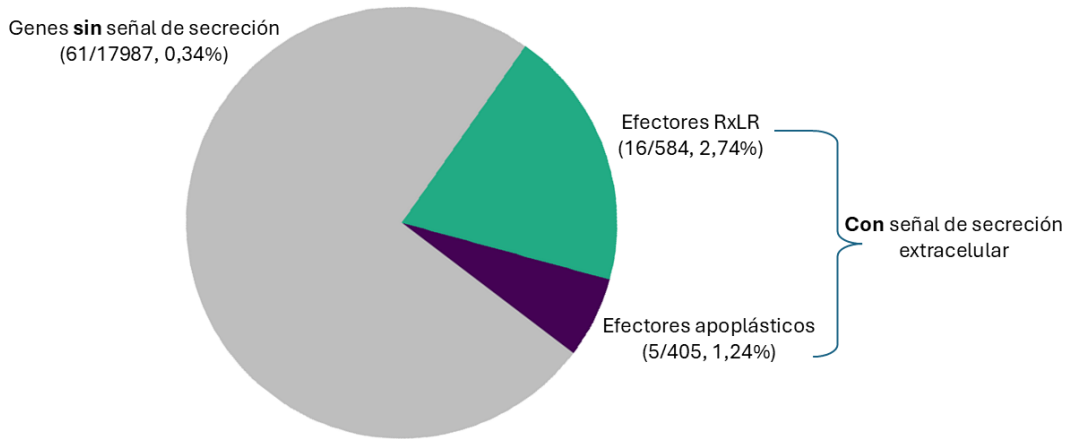


Figura 16: Efectores ausentes en PiNSL-19. El gráfico muestra la cantidad de genes sin señal de secreción (gris), efectores RxLR (turquesa) y efectores apoplásticos (violeta) que no presentan cobertura en la secuenciación del genoma de este aislamiento respecto al genoma de referencia T30-4.

Dentro del conjunto de genes con cobertura “cero” en PiNSL-19, nos resulta de particular interés el gen correspondiente al efector de tipo RxLR *AVR1* (*PITG_16663*) (Figura 17). Este efector es reconocido por el receptor inmune de *S. tuberosum* *R1* que está presente en las variedades de papa Spunta, Kennebec e Innovator, entre otras (Armstrong et al., 2018).

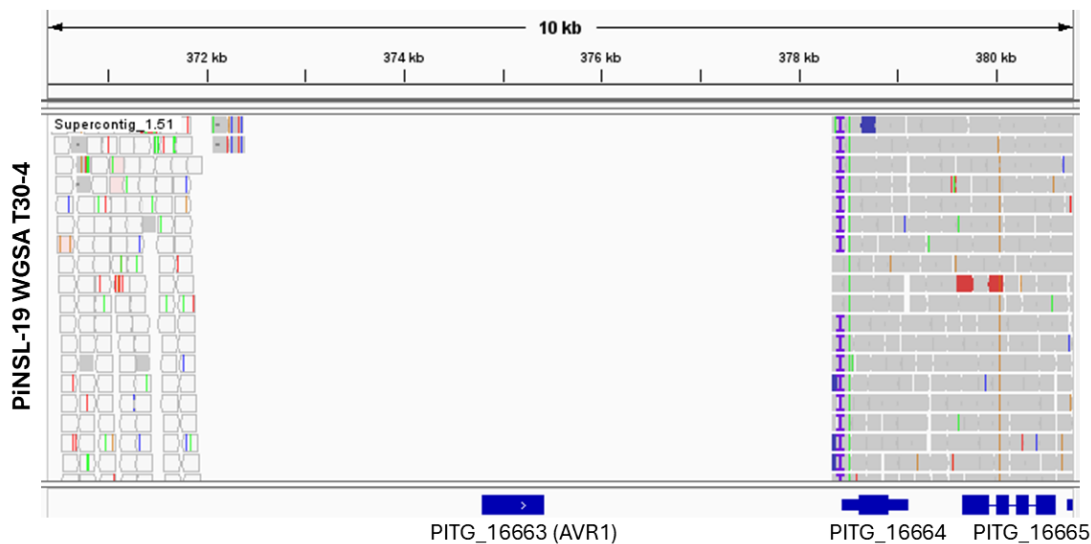


Figura 17: Ausencia del locus de AVR1 en PiNSL-19: Visualización de la cobertura de la secuenciación de PiNSL-19 en una ventana de 10kb alrededor del gen *AVR1*, donde se muestra la falta de cobertura del gen para este aislamiento, indicando la pérdida de la región.

Genómica comparativa de PiNSL-19 con aislamientos de *P. infestans* de otras partes del mundo

Con el objetivo de determinar si el linaje clonal EU_2_A1 identificado en Argentina guarda relación con aislamientos de otras regiones del mundo, exploramos bases de datos públicas en busca de genomas secuenciados que pudieran compartir similitudes con *PiNSL-19*. Específicamente, recurrimos al *Sequence Read Archive* (SRA) de NCBI para identificar aislamientos que pertenecieran al mismo genotipo o que mostraran una relación filogenética cercana. Esto permitiría aprovechar información ya disponible y evaluar si existían estudios previos sobre aislamientos relacionados con *PiNSL-19*.

Para abordar esta cuestión, comparamos *PiNSL-19* con un conjunto de aislamientos secuenciados con tecnologías similares, incluyendo representantes de linajes bien caracterizados, como US-1 y US-23. También incluimos una muestra de *Phytophthora mirabilis* como *outgroup*. La lista completa de aislamientos utilizados en este análisis se detalla en la Tabla 4. El número de SNPs detectados para cada muestra en relación al genoma de referencia (Haas et al., 2009) se presenta en la figura 18.

Nombre	Especie	Año	Hospedador	Origen	Accession Number
CBS.678.85	<i>P. mirabilis</i>	2020	Desconocido	México	SRR9106156
HB1505	<i>P. infestans</i>	2015	<i>S. tuberosum</i>	China	SRR10999783
HN1602	<i>P. infestans</i>	2016	<i>S. tuberosum</i>	China	SRR10999782
Kr1_A1	<i>P. infestans</i>	2016	<i>S. tuberosum</i>	Corea del Sur	SRR11592936
Kr2_A2	<i>P. infestans</i>	2015	<i>S. tuberosum</i>	Corea del Sur	SRR11592934
Eg_73	<i>P. infestans</i>	2019	<i>S. tuberosum</i>	Egipto	DRR160350
US23	<i>P. infestans</i>	2009	<i>S. tuberosum</i>	USA	ERR299558
DDR7602	<i>P. infestans</i>	1976	<i>S. tuberosum</i>	Alemania	ERR248813
LBUS5	<i>P. infestans</i>	2005	<i>Petunia x hybrida</i>	Sudáfrica	ERS226849
US8	<i>P. infestans</i>	2009	<i>S. lycopersicum</i>	USA	ERR299556
P13626	<i>P. infestans</i>	2003	<i>S. tuberosum</i>	Ecuador	ERR248796
PiNSL-19	<i>P. infestans</i>	2019	<i>S. tuberosum</i>	Argentina	Este trabajo

Tabla 4: Aislamientos utilizados para el análisis de polimorfismos de nucleótido simple a nivel genómico.

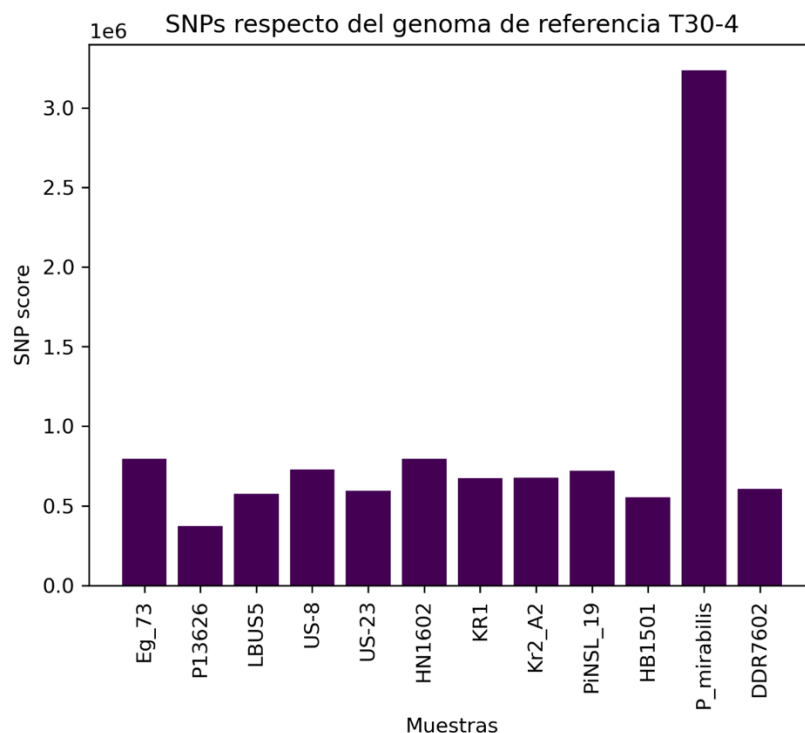


Figura 18. Comparación del número de SNPs en *PiNSL-19* y otros aislamientos de *P. infestans* respecto al genoma de referencia T30-4. Gráfico de barras mostrando la cantidad de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) detectados en cada aislamiento analizado en comparación con la cepa de referencia T30-4. El número de SNPs está representado en millones.

Para inferir las relaciones filogenéticas, utilizamos dos aproximaciones complementarias: árboles construidos a partir de matrices de distancia de Jaccard mediante *clustering* jerárquico y árboles de Máxima Verosimilitud basados en la concatenación de posiciones variantes. Además, analizamos la ocurrencia de polimorfismos compartidos entre pares de muestras, permitiendo establecer posibles agrupamientos genéticos. La metodología completa utilizada en estos análisis se encuentra detallada en la sección de Materiales y Métodos.

Ambas estrategias de análisis filogenético produjeron resultados congruentes, con una topología de árbol consistente entre métodos. Como era esperado, los pares de aislamientos LBUS5–DDR7602 (US-1) y Eg73–US23 (US-23) se agruparon estrechamente, reflejando su origen común (Figuras 19 y 20). En contraste, *PiNSL-19* mostró una asociación con el aislamiento HN1602 de China, aunque la escasa longitud de la rama que los conecta sugiere que esta relación podría deberse a un artefacto más que a un parentesco real.

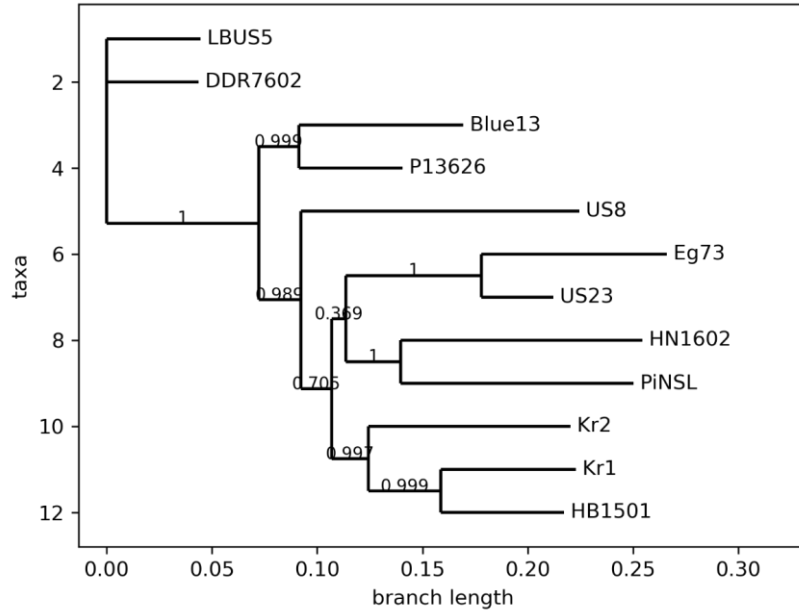


Figura 19. Relación filogenética de *PiNSL-19* con otros aislamientos de *P. infestans* basada en SNPs de genoma completo. Árbol de Máxima Parsimonia generado a partir del alineamiento múltiple de secuencias basado en la concatenación de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Los valores en las ramas indican soporte de *bootstrap*.

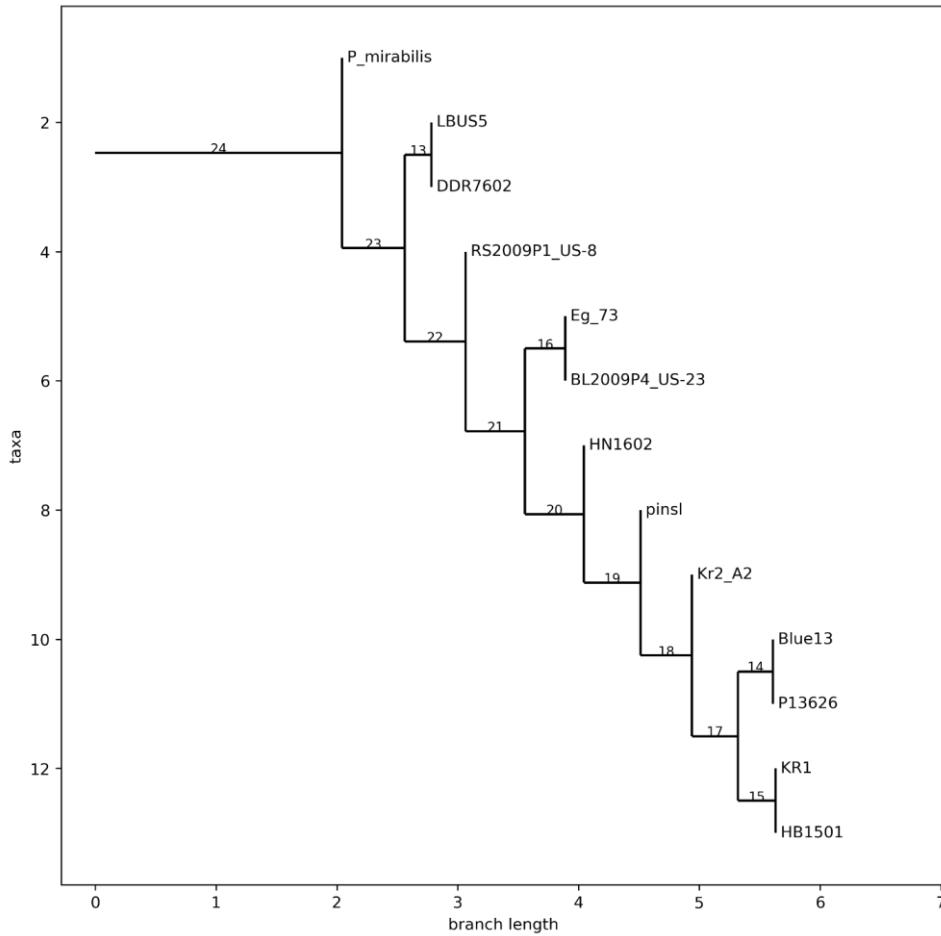


Figura 20. Árbol de Máxima Verosimilitud basado en SNPs de genoma completo de *P. infestans*. Árbol filogenético construido mediante el método de Máxima Verosimilitud a partir de matrices de distancias de Jaccard de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) detectados en los aislamientos analizados.

Para profundizar en esta observación, analizamos la distribución de polimorfismos compartidos mediante diagramas de Venn, lo que permitió visualizar la cantidad de SNPs en común entre *PiNSL-19* y los distintos linajes analizados. Se observó que los aislamientos US-1 y US-23 compartían más SNPs entre sí que con *PiNSL-19*, mientras que la relación con HN1602 no mostró el mismo patrón de similitud, respaldando la idea de que la agrupación entre ambos podría no reflejar un parentesco biológico (Figura 21).

En conclusión, este análisis no identificó en las bases de datos públicas ningún aislamiento que pudiera ser claramente asignado al mismo genotipo que *PiNSL-19*. Esto sugiere que *PiNSL-19* podría representar el primer aislamiento secuenciado de este genotipo, lo que resalta la importancia de su caracterización y sugiere la necesidad de futuros estudios que permitan comprender mejor su relevancia epidemiológica y su relación con otras poblaciones de *P. infestans*.

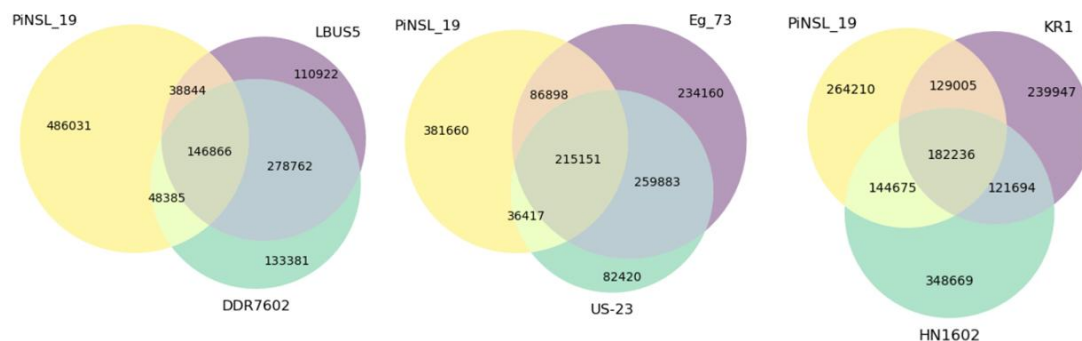


Figura 21. Comparación de SNPs compartidos entre *PiNSL-19* y otros aislamientos de *P. infestans*. Diagramas de Venn mostrando la cantidad de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) compartidos entre *PiNSL-19* y aislamientos de distintos linajes. (*Izquierda*) Comparación con aislamientos del linaje US-1 (LBU55 y DDR7602). (*Centro*) Comparación con aislamientos del linaje US-23 (Eg_73 y US-23). (*Derecha*) Comparación con los aislamientos KR1 y HN1602.

Capítulo II:

Estudio de la expresión in planta de genes de
P. infestans PiNSL-19 durante la interacción con
S. tuberosum var Spunta

Expresión de genes in planta de *P. infestans* PiNSL-19 durante la infección de *S. tuberosum* var. Spunta

Decidimos a continuación estudiar la expresión de genes de *P. infestans* PiNSL-19 *in planta*, durante su interacción con papa variedad Spunta, con especial foco en los genes correspondientes a efectores. Para ello, realizamos un estudio de secuenciación masiva de ARN (*RNA-seq*), tomando muestras de tejido foliar a las 0, 16, 24, 48 y 72 horas post inoculación (hpi) con gotas conteniendo una suspensión de 50000 zoosporas/ml. Estos experimentos se realizaron por triplicado. Extrajimos el ARN total de cada muestra, cuya calidad se determinó por observación de integridad de bandas ribosomales en gel de agarosa, y utilizando un fluorómetro Qubit (Figura 22).

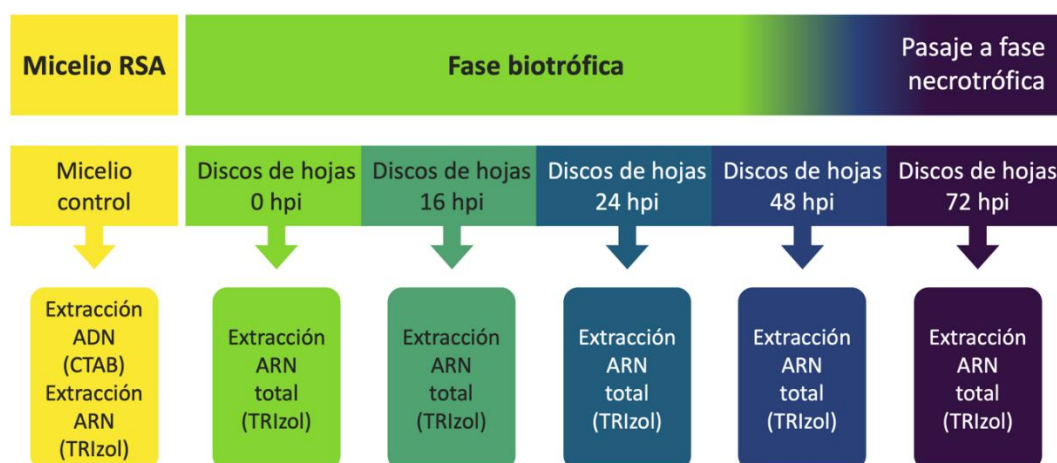


Figura 22: Diseño experimental de la infección con *P. infestans* PiNSL-19 de plantas de *S. tuberosum* var Spunta. Se realizaron tres experimentos independientes, y en cada tiempo post-inoculación (hpi: horas post infección) se tomaron muestras para la extracción de ARN total utilizando TRIzol. La expresión de los distintos genes para cada tiempo estudiado se relativizó a muestras control de micelio crecido en placa RSA.

La secuenciación, servicio prestado por la empresa Novogene con un equipo Illumina Hiseq 150bp PE, se realizó a una profundidad de 30 millones de lecturas por muestra. Fueron excluidos del análisis los tiempos de 0 y 16hpi debido a una baja cobertura del transcriptoma de *P. infestans*. Atribuimos esta baja cobertura a la escasa relación de masa del patógeno respecto del tejido vegetal, ya que las infecciones comenzaban a establecerse y esto derivó en una cobertura muy elevada del hospedante y una muy baja del patógeno (Tabla 5).

Muestra	Grupo	Lecturas totales	Concordantes	Discordantes	% mapeado
A1	0hpi	30874305	9377	2973	0,04%
A4	48hpi	32464073	2750508	219955	9,15%
B1	0hpi	42881429	13510	3643	0,04%
B2	16hpi	30918272	14185	1274	0,05%
B3	24hpi	32588704	37382	4983	0,13%
B4	48hpi	32691303	763352	53931	2,5%
B5	72hpi	30707777	5600017	381858	19,48%
C1	0hpi	31938856	8449	1133	0,03%
C2	16hpi	30299482	32336	4023	0,12%
C3	24hpi	31765586	17062	1997	0,06%
C4	48hpi	31595996	526536	39032	1,79%
C5	72hpi	32452933	3819479	347478	12,84%
Ctrl1	Micelio	31004013	26246511	2612024	93,08%
Ctrl2	Micelio	32458648	28380183	2264027	94,41%

Tabla 5: Métricas de los alineamientos al transcriptoma de referencia (cepa T30-4) de las lecturas obtenidas para cada tiempo de infección de *S. tuberosum* var Spunta con el aislamiento PiNSL-19 de *P. infestans*.

Después de alinear con al genoma de referencia de la cepa T30-4, utilizando un archivo GTF para asignar lecturas a genes anotados, se contabilizaron las lecturas sobre cada gen con HTseq y la expresión génica diferencial se midió con el paquete DEseq2. Los genes se consideraron diferencialmente expresados cuando su valor *p-adj* fue <0.05 y el aumento en la expresión 16 veces superior ($LFC > 4$) respecto al valor de expresión en micelio creciendo en placa RSA. De los 18170 genes anotados en el genoma de referencia, encontramos que en nuestras muestras 3835 presentaban una cobertura inferior a 100 lecturas entre todas las muestras (Figura 24). Utilizamos este número como criterio para filtrar genes con muy bajos niveles de expresión y evitar alineamientos espurios.

Luego, nos enfocamos en los genes anotados con señal de secreción. De este listado de 989 genes anotados en la cepa T30-4, encontramos la expresión de 511 en PiNSL-19 en al menos uno de los tiempos medidos. Respecto del set de 23 efectores que seleccionáramos previamente, encontramos la expresión de 19 en al menos una condición (figura 23 ; figura 25 a, b y c).

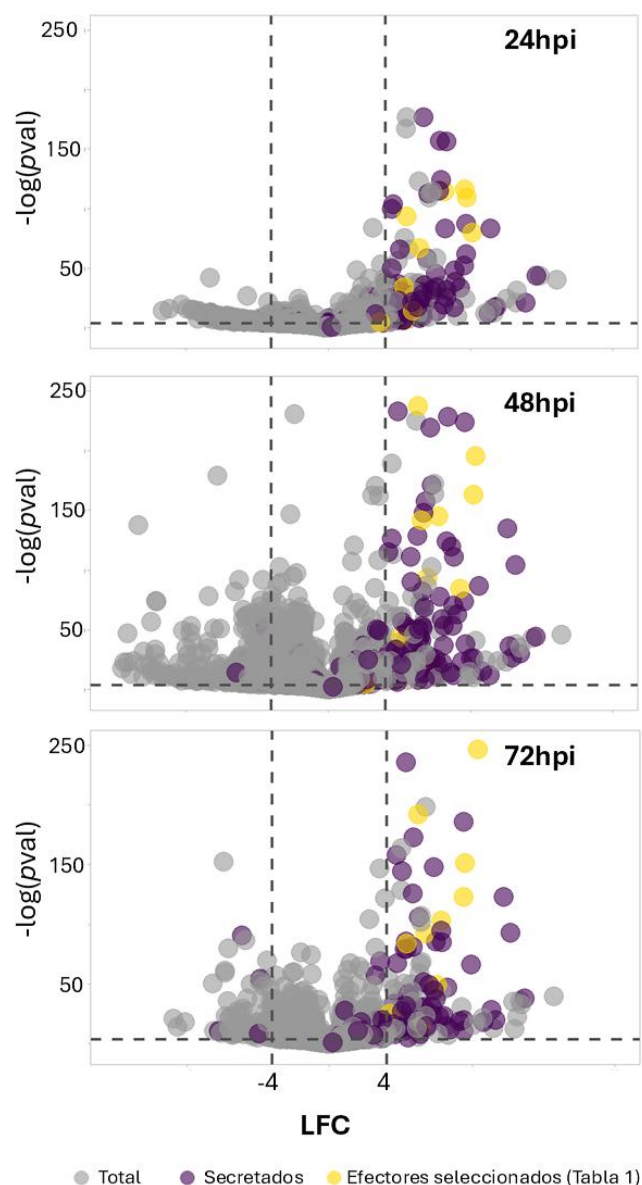


Figura 23. Análisis de expresión diferencial de genes en PiNSL-19 durante la infección de *S. tuberosum* var. Spunta. Gráficos tipo *volcano plot* mostrando los genes diferencialmente expresados (p -valor < 0.05) a las 24 hpi (izquierda), 48 hpi (centro) y 72 hpi (derecha). En violeta se representan todos los genes, en gris aquellos con señal de secreción y en amarillo los efectores de importancia agronómica definidos previamente (Tabla 1). Las líneas punteadas verticales muestran valores de LFC de -4 y 4 y la línea horizontal el p -valor = 0.05.

Por otro lado, identificamos 478 genes con señal de secreción que no se expresaron *in planta*, de los cuales 371 pertenecen a la familia RxLR. La mayoría de estos genes fueron anotados como RxLR putativos, aunque entre ellos destacan *AVR3b* (*PITG_18215*), *AVR1* (*PITG_16663*) y *AVR4* (*PITG_07387*), junto con miembros de las familias *AVR2* y *AVRblb2*. En particular, dentro de *AVRblb2*, observamos la ausencia de las variantes *PITG_20301* y

PITG_20303, previamente descritas por su asociación con el “quiebre” de la resistencia mediada por *Rpi-blb2* (Oliva et al., 2015).

En cuanto a otros tipos de efectores, detectamos 12 genes de la familia *Crinkler* y 95 efectores apoplásticos con escasa cobertura, lo que sugiere que estos genes tienen una baja o nula actividad transcripcional durante la infección de *S. tuberosum* var. Spunta (Figura 24).

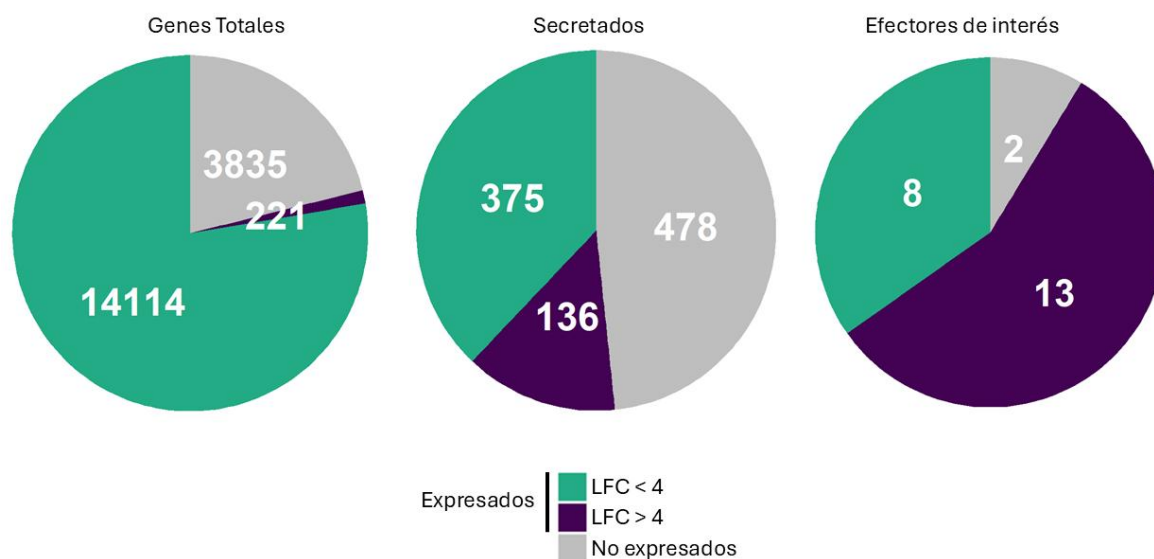


Figura 24. Expresión de genes de PiNSL-19 durante la infección de *S. tuberosum* var. Spunta. Diagramas de torta mostrando la proporción de genes no expresados (gris), expresados sin cambios respecto del control (verde) y diferencialmente expresados (violeta). Se presentan tres categorías: todos los genes (izquierda), genes con señal de secreción (centro) y efectores de interés agronómico (derecha).

Entre los genes que codifican efectores inducidos (de acuerdo con los criterios p -valor ajustado $< 0,05$ y $LFC > 4$), 53 se expresan en todas las etapas de infección analizadas, 14 solo a las 24 hpi, 6 a las 48 hpi, 20 a las 24 y 48 hpi, y 8 a las 48 y 72 hpi. No se identificó ningún efector inducido exclusivamente a las 72 hpi según los criterios seleccionados. (Figura 25 d).

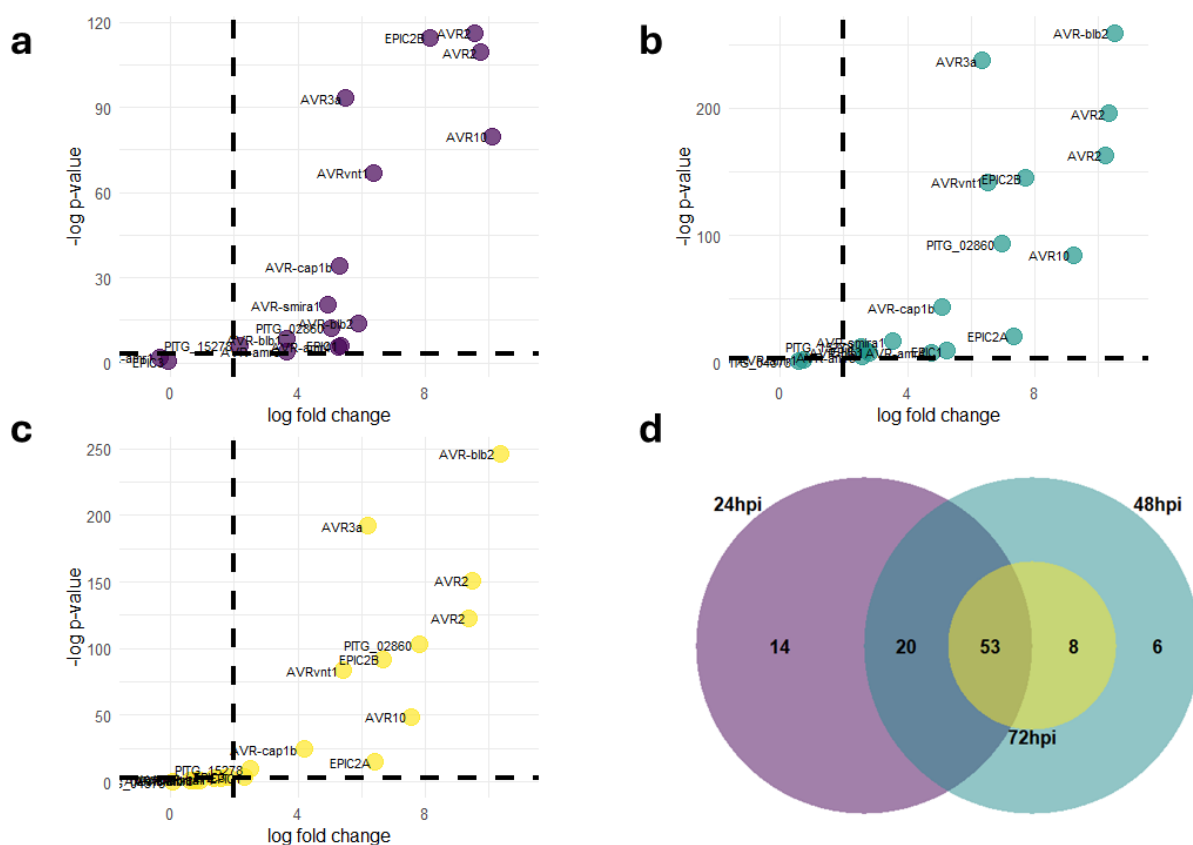


Figura 25. Expresión diferencial de efectores de interés agronómico en PiNSL-19 durante la infección de *S. tuberosum* var. Spunta. (a–c) Gráficos tipo *volcano plot* mostrando los efectores diferencialmente expresados a las 24 hpi (a, violeta), 48 hpi (b, turquesa) y 72 hpi (c, amarillo). Se presentan los valores de *log fold change* en el eje x y la significancia estadística ($-\log_{10} p\text{-valor}$) en el eje y. (d) Diagrama de Venn representando el número de efectores inducidos en cada tiempo post-inoculación y su solapamiento entre condiciones.

Con el objetivo de determinar el enriquecimiento en anotaciones funcionales asociadas a los genes de *P. infestans* inducidos *in planta* durante la infección de Spunta, obtuvimos una lista de 221 genes que cumplieran con la condición de tener su expresión aumentada en 16 veces respecto del control ($LFC > 4$) en al menos un tiempo de infección (Figura 26). Por otro lado, como se mencionó previamente, consideramos genes no expresados a aquellos cuya suma de lecturas entre todas las muestras no superara las 100 lecturas.

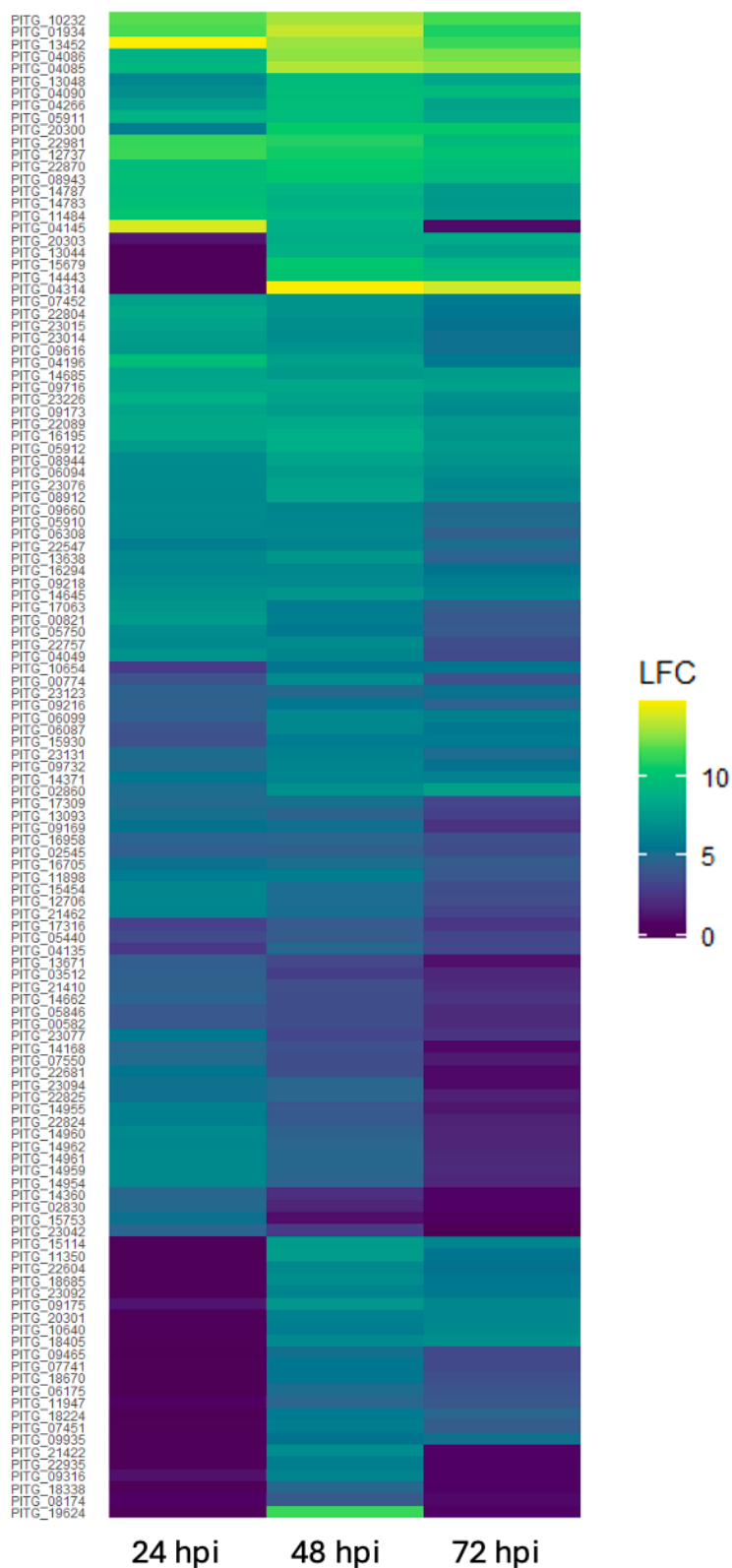


Figura 26: Expresión de genes de *P. infestans* PiNSL19 inducidos *in planta* durante la interacción con papa variedad Spunta. *Heatmap* de 221 genes inducidos en al menos uno de los tiempos evaluados (LFC>4). Las columnas indican las horas post inoculación (hpi), yendo de 24 a 72 horas post infección (hpi) y la escala de colores el cambio en la expresión respecto del control.

Enriquecimiento funcional de genes de PiNSL-19 inducidos durante la colonización de papa Spunta

Tras identificar los genes altamente inducidos (LFC>4), realizamos una caracterización funcional utilizando la herramienta *g:Profiler* y su función *g:GOst* (Figura 27, Tabla 6).

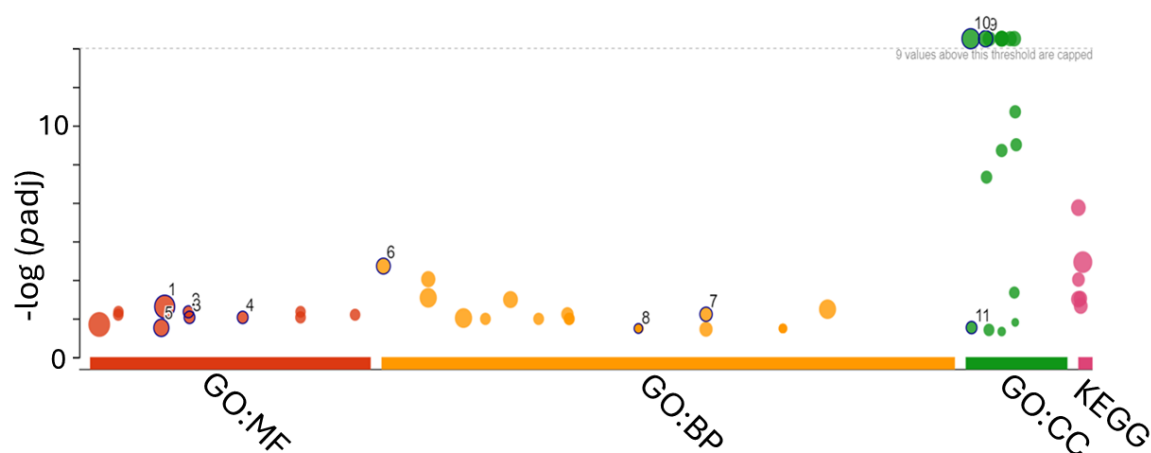


Figura 27. Enriquecimiento funcional de genes sobre-expresados en PiNSL-19 durante la infección de *S. tuberosum* var. Spunta. Análisis realizado con *g:Profiler*, mostrando los términos más enriquecidos en función molecular (*GO:MF*), proceso biológico (*GO:BP*), componente celular (*GO:CC*) y rutas metabólicas (*KEGG*). La significancia estadística se expresa como $-\log_{10}(p\text{-valor ajustado})$.

ID	Fuente	ID de término GO	Nombre del término	Padj
1	GO:MF	GO:0016787	Hidrolase activity	2.42×10^{-3}
2	GO:MF	GO:0030414	Peptidase inhibitor activity	4.48×10^{-3}
3	GO:MF	GO:0030599	Pectinesterase activity	8.71×10^{-3}
4	GO:MF	GO:0045330	Aspartyl esterase activity	8.71×10^{-3}
5	GO:MF	GO:0016614	Oxidoreductase activity, acting on CH-OH group	3.03×10^{-2}
6	GO:BP	GO:0000272	Polysaccharide catabolic process	1.91×10^{-5}
7	GO:BP	GO:0071555	Cell wall organization	5.99×10^{-3}
8	GO:BP	GO:0052167	Perturbation of host innate immune response	3.27×10^{-2}
9	GO:CC	GO:0018995	Host cellular component	2.68×10^{-48}
10	GO:CC	GO:0005576	Extracellular region	1.08×10^{-32}
11	GO:CC	GO:0005618	Cell wall	1.94×10^{-2}

Tabla 6: Lista de términos GO enriquecidos entre los genes de *P. infestans* inducidos durante la infección de *S. tuberosum* var Spunta.

El análisis de enriquecimiento reveló una fuerte inducción de genes asociados a procesos clave en la interacción con el hospedador, incluyendo componentes celulares del hospedante (*GO:0018995*), perturbación de su respuesta inmune (*GO:0052167*) y localización en la región extracelular (*GO:0005576*). Además, se observaron términos funcionales relacionados con la modulación de la inmunidad, como inhibidores de peptidasas y actividad hidrolasa. Este perfil de enriquecimiento es consistente con las estrategias conocidas de *P. infestans* para colonizar a su hospedador. En este contexto, el análisis funcional confirma la activación de mecanismos asociados a la supresión de la defensa de *S. tuberosum* y a la adaptación del patógeno al ambiente extracelular. A partir de estos resultados, continuamos el estudio centrándonos en los genes que codifican proteínas secretadas, ya que dentro de este grupo se encuentran varias proteínas relevantes para objetivos de mejoramiento del cultivo.

Expresión diferencial de un conjunto de efectores de relevancia agronómica

Uno de los objetivos del grupo de trabajo es implementar resistencia duradera al tizón tardío a campo. En ese contexto, deseamos en particular explorar en las poblaciones argentinas de *P. infestans* aspectos relacionados a efectores que consideramos tienen relevancia para informar a programas de mejoramiento de papa. Incluimos en esta lista aquellos efectores reconocidos por proteínas R bien caracterizadas, efectores con capacidad de modular la respuesta inmune y efectores apoplásticos cuyos blancos en el hospedador son candidatos para estrategias de edición génica (tabla 1).

La mayoría de los genes estudiados de esa selección mostraron inducción durante la interacción con papa Spunta. Excluimos los efectores *AVR4*, *AVRsmira2* y *AVamr17* debido a que muestran una cobertura muy baja en los datos transcriptómicos tanto en micelio crecido en placa como en las etapas de infección, y *AVR1* por ausencia de locus. Los 19 efectores restantes se pueden catalogar en 3 modos de expresión. El primer grupo lo componen genes inducidos en todos los tiempos observados, y lo componen los efectores RxLR *AVR2*, *AVRblb2*, *AVR3a*, *AVR10*, *AVRamr16*, *AVRcap1b*, *AVRvnt1* y los inhibidores de la proteasa C14 *EpiC2A* y *EpiC2B*. Un segundo grupo exhibe expresión temprana que decae con el paso de las horas e incluye a *AVRamr4*, *AVRsmira1*, *AVRblb1*, *AVRamr3* además de la proteasa apoplástica *EpiC1*. Por último, encontramos un tercer grupo cuyos niveles de expresión no varían respecto del control y no se encuentran inducidos en Spunta, aunque sostienen distintos niveles de expresión los efectores *AVRamr1*, *AVRamr17*, *PITG_15278* y *EPIC3* (Figura 28). Cabe destacar dentro de este grupo que, si bien la inducción de los genes

AVRamr1 y *AVRcap1b* no es significativa, sus niveles de expresión fueron altos, promediando un TPM (Transcripts por millón) de 46,3 y 324,5 respectivamente.

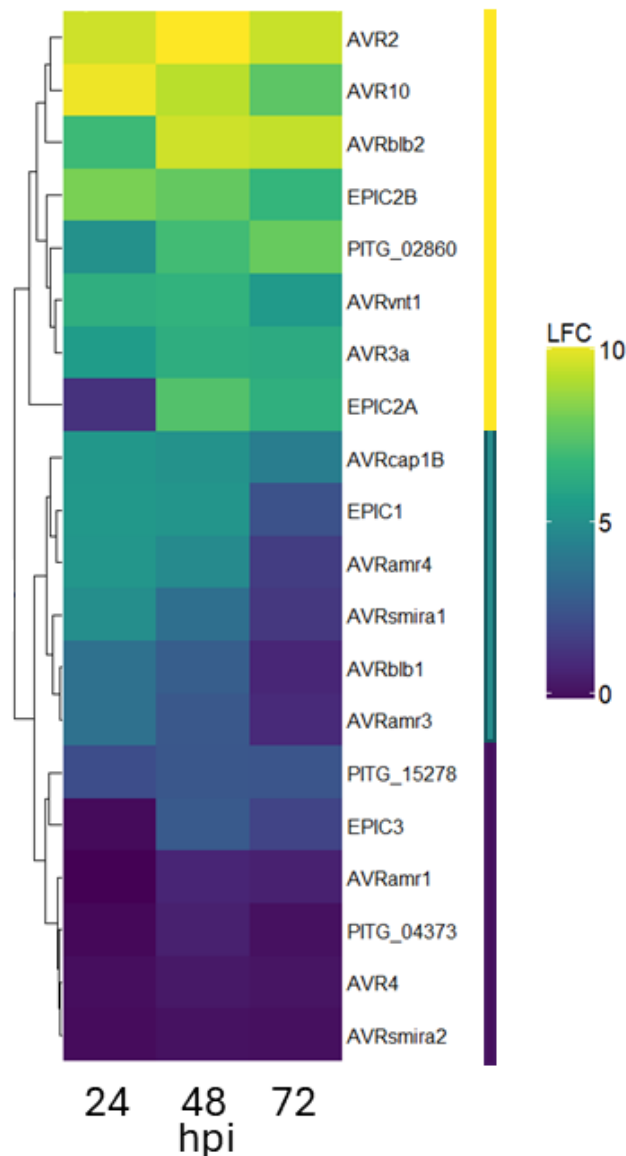


Figura 28. Expresión temporal de efectores de *P. infestans* durante la infección. Heatmap que muestra los niveles de expresión de distintos efectores de *P. infestans* en tres tiempos post-infección (hpi: horas post-inoculación). La intensidad del color indica el log2 fold change (LFC) de la expresión, con valores altos en amarillo y bajos en púrpura. Ordenar estos genes por *clustering* jerárquico separa tres ramas principales, obteniendo genes de altos (barra lateral amarilla), medios (cian) y bajos (violeta) niveles de inducción *in planta*.

Análisis de polimorfismos en un set de efectores de PiNSL-19 reconocidos por proteínas R

La observación frecuente de polimorfismos en los efectores de *Phytophthora* contribuye a la virulencia y a la ruptura de la resistencia. En el marco de la tesis de grado del ahora Lic. Juan Azcue, exploramos el polimorfismo de secuencias (y la presencia de variantes alélicas) en una selección de efectores de PiNSL-19 que son blanco de reconocimiento por proteínas R. Para ello, utilizamos un *pipeline* de llamado de variantes de genes utilizando los programas bcftools y bedtools (ver Materiales y Métodos) para identificar discrepancias de aminoácidos en comparación con el genoma de referencia T30-4, e hicimos un curado manual de las secuencias mediante la visualización en el visualizador de genomas IGV (Thorvaldsdóttir et al., 2012). No detectamos diferencias de secuencia a nivel de aminoácidos respecto de T30-4 para efectores clave como *AVR3a*, *AVRblb2*, *AVRvnt1*, *AVRsmira2* y *AVR10*. Nos propusimos hacer un curado manual de las secuencias de los efectores *AVRamr1*, *AVRamr3* y *AVRblb1*. El análisis en su trabajo incluyó la secuenciación por Sanger de estos genes para los aislamientos Tafi, Cba2 y Ar20079. Pudimos determinar que las variantes alélicas presentes en Tafi, Cba2 y Ar20079 son iguales a las observadas en PiNSL-19. Navegando el genoma con el visor de genoma IGV, discriminamos haplotipos e investigamos las variantes expresadas. Esto nos permitió filtrar aquellas mutaciones que implicaran un cambio de aminoácido respecto a T30-4 e inferir el impacto del cambio en función de la escala AMAS (*Alignment Matrix-based Amino acid conservation Score*), que es una técnica utilizada para medir la conservación de aminoácidos en alineamientos múltiples de secuencias. Se basa en una matriz de sustitución y pondera la frecuencia de cada aminoácido en una posición dada, considerando su similitud bioquímica con otros residuos para asignar una puntuación de conservación.

AVRamr1 presentó 5 cambios de aminoácido distribuidos en 2 haplotipos (Figura 29). Uno de ellos igual al genoma de referencia T30-4 y otro a un haplotipo descrito en el aislamiento coreano KR_2_A2 (Seo, 2022). En el caso de *AVRamr3*, encontramos un solo cambio de aminoácido (Figura 29), e identificamos también 2 haplotipos, uno perteneciente al genoma de referencia y otro descrito en aislamientos de los genotipos EC1 y KR1 (Lin, 2022).

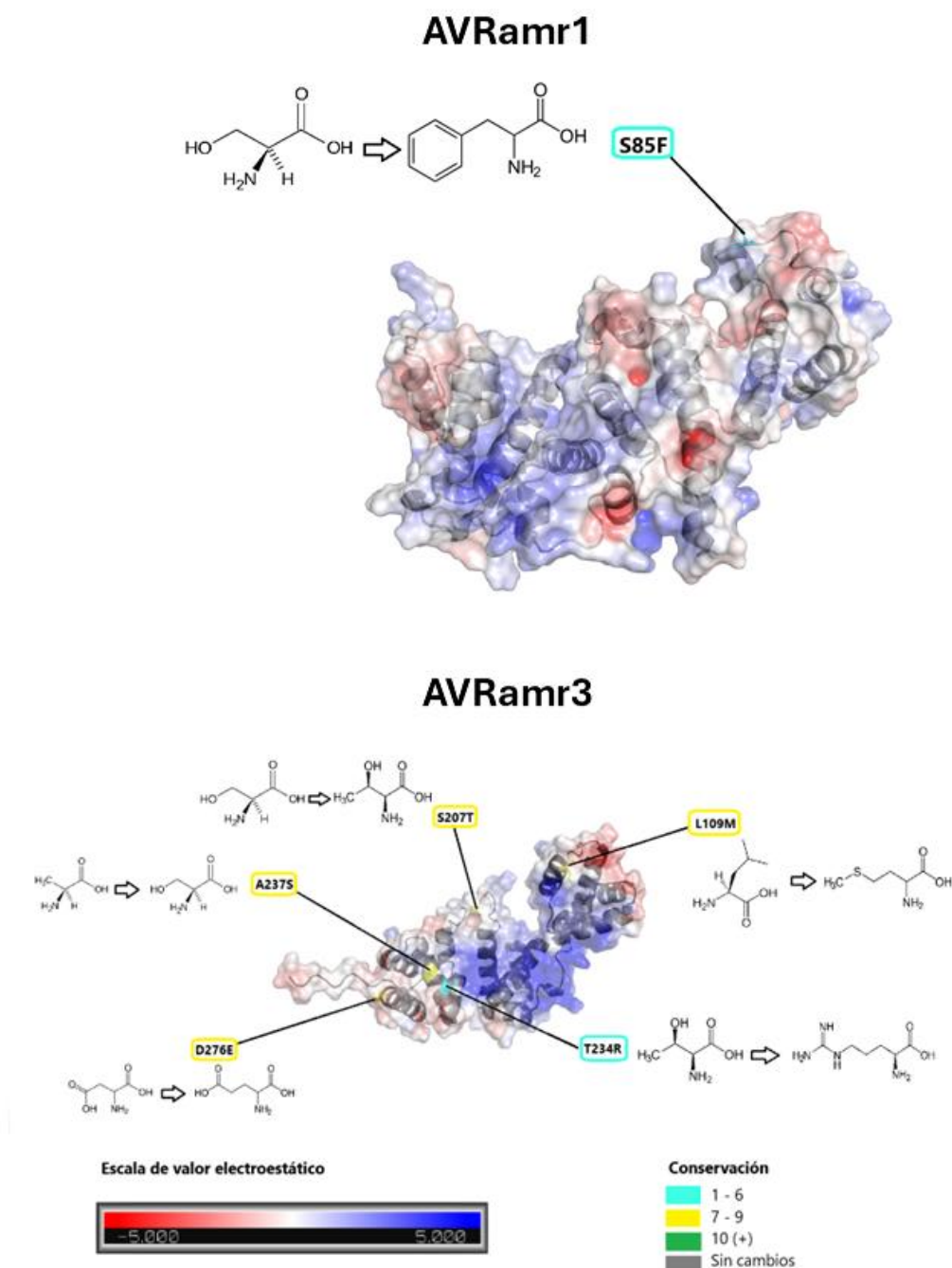


Figura 29. Análisis de variabilidad en los efectores *AVRamr1* y *AVRamr3* de *P. infestans* PiNSL-19. Representación estructural de *AVRamr1* (arriba) y *AVRamr3* (abajo), destacando los residuos polimórficos detectados en *PiNSL-19*. La escala de colores indica la conservación evolutiva de los residuos, desde baja (verde) hasta alta (azul oscuro). El mapeo del potencial electrostático en la superficie de las proteínas ilustra posibles implicancias funcionales de estas mutaciones en la interacción con proteínas de resistencia del hospedador.

En el caso del efector *AVRblb1*, identificamos tres haplotipos: i), uno descrito por Beketova (2014) del cual no hay información relacionada a la virulencia ii) uno descrito por Khavkin (2011) que resulta avirulento ante germoplasma de *Solanum sp.* que expresa el gen

Rpi-blb1, y iii) el descrito en el genoma de referencia. Cabe destacar que este gen tiene una relación de tasas de sustitución no sinónimas (dN) a sinónimas (dS) (dN/dS) mayor a 1, sugiriendo presión evolutiva sobre este locus. Esta información nos llevó a buscar mayores detalles de las variantes de *AVRblb1* expresadas en PiNSL-19. Para ello realizamos un alineamiento múltiple de las secuencias anotadas como *AVRblb1* de PiNSL-19 con las variantes canónicas del gen, pudiendo así identificar los alelos *ipi01* (SeqID: D0P3S7.1), *ipi02* (SeqID: AAA21423.1) e *ipi03* (SeqID: ACU56985.1) reportados por Chen et al. (2017) (Figura 30). No detectamos la presencia del alelo *ipi04*, capaz de quebrar la resistencia mediada por la proteína *Rpi-blb1*. Este hallazgo sugiere que la incorporación del gen *Rpi-blb1* en Spunta (u otras variedades susceptibles) sería una alternativa efectiva para conferir resistencia al tizón tardío ocasionado por el aislamiento PiNSL-19 (Figura 31).

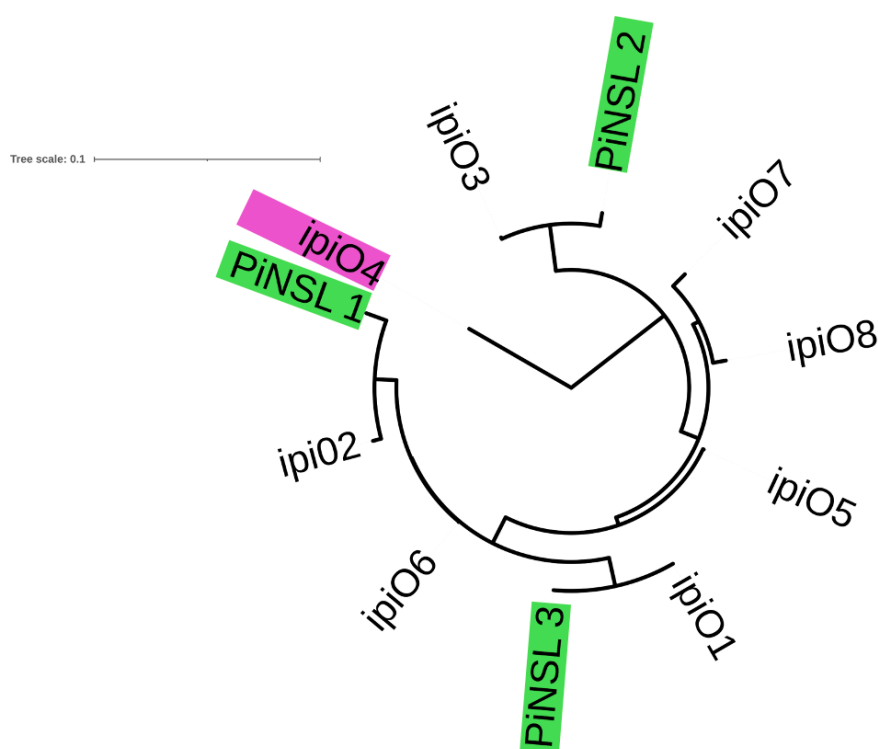


Figura 30. Relación filogenética de las variantes de *AVRblb1* en *P. infestans* PiNSL-19. Árbol filogenético construido mediante el método *Maximum Likelihood*, comparando las variantes de *AVRblb1* detectadas en *PiNSL-19* con las variantes canónicas previamente descritas (*ipi01–ipi011*). PiNSL1, 2 y 3 (verde) son las variantes alélicas de *AVRblb1* detectadas en este aislamiento. Se destaca en lila *ipi04* (variante virulenta). El largo de las ramas indica la distancia evolutiva estimada en términos de sustituciones por sitio en la secuencia proteica.

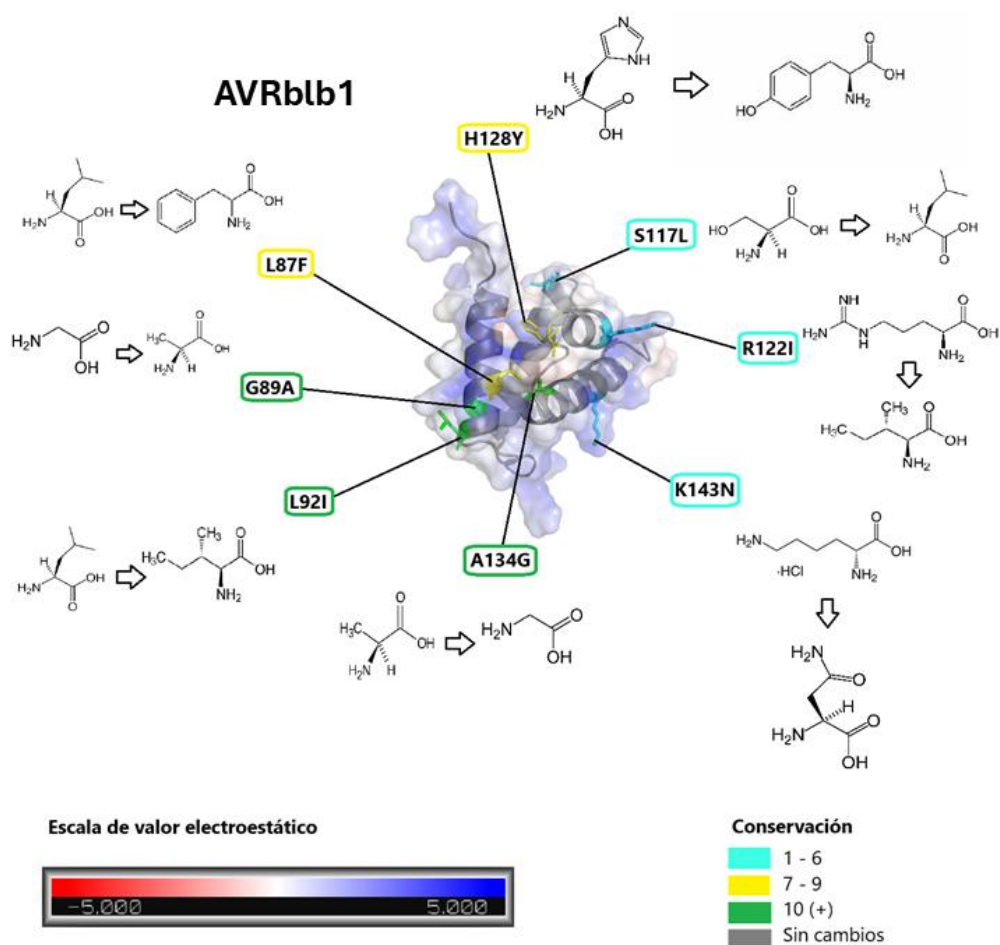


Figura 31. Variantes de *AVRblb1* y su conservación evolutiva. Estructura tridimensional del efector *AVRblb1* de *Phytophthora infestans*, con las posiciones de aminoácidos variables resaltadas. Cada mutación está etiquetada junto con su sustitución correspondiente, y su grado de conservación se indica mediante un código de colores: cian (baja conservación, 1-6), amarillo (moderada, 7-9) y verde (alta, 10 o más). La superficie de la proteína está coloreada según su potencial electrostático, Adaptado de Juan Azcue.

Familias de efectores *AVRblb2* y *AVR2*: análisis de perfiles de expresión en PiNSL-19 durante la infección en Spunta

Evaluamos la expresión de los 7 parálogos identificados dentro de la familia *AVRblb2* para los cuáles el reconocimiento mediado por *Rpi-blb2* está descrito. Se detectó la expresión inducida *in planta* de los parálogos *PITG_04085*, *PITG_04086*, *PITG_04090* y *PITG_20300*, presentando todos ellos patrones de expresión similares entre sí (Figura 32). En esta tesis adoptamos *PITG_20300* como parálogo representativo de este subgrupo, ya que esta variante suele ser mencionada como *AVRblb2* en la literatura.

Además, encontramos inducidos otros dos genes dentro de esta familia, *PITG_18670* y *PITG_18675* (no incluídos entre los 7 parálogos mencionados previamente), que presentan

patrones de expresión similares entre sí pero distintos a los observados para los parálogos representados por *PITG_20300*.

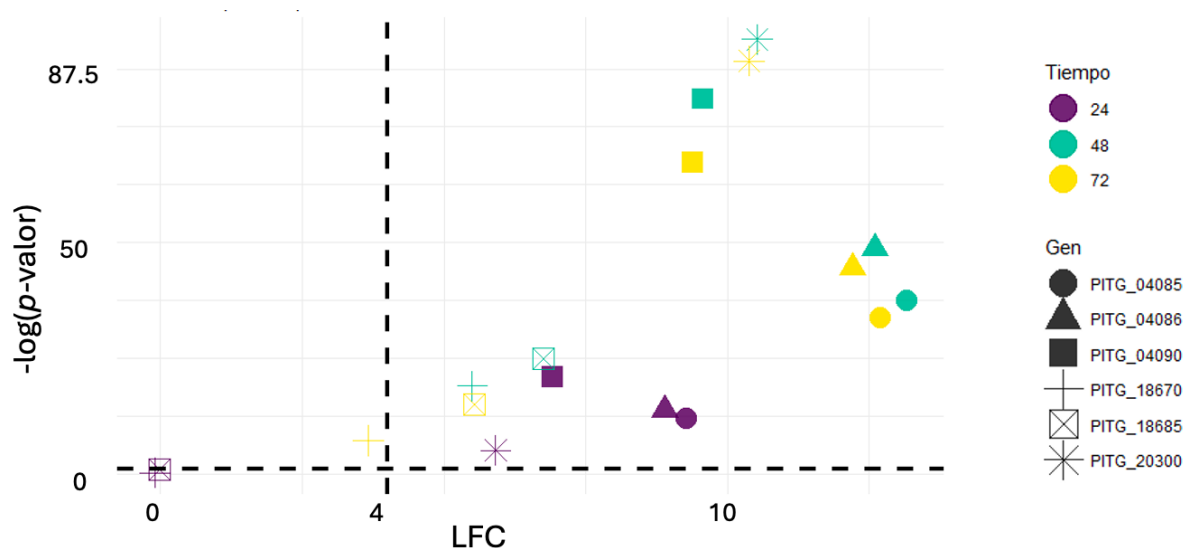


Figura 32. Expresión diferencial de los parálogos de *AVRb1b2* en PiNSL-19 durante la infección. Volcano plot que muestra la expresión diferencial de los genes de la familia *AVRb1b2* en PiNSL-19 en distintos tiempos post-inoculación (hpi) en *S. tuberosum* var. Spunta. El eje x representa el log₂ Fold Change (LFC) y el eje y el -log₁₀ del valor de *p*. Cada forma representa un gen y el color su nivel de expresión en diferentes tiempos post-inoculación (24 hpi, 48 hpi y 72 hpi). La línea discontinua horizontal indica el umbral de significancia estadística, mientras que la línea vertical marca un punto de referencia en el LFC.

En la Figura 33 se muestra un alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a la región C-terminal (efector maduro, posterior al motivo RxLR) de los 6 miembros de la familia expresados *in planta* durante la interacción PiNSL-19/Spunta. Se observa que, si bien *PITG_18670* y *PITG_18675* fueron detectados *in planta*, su secuencia es divergente respecto a los 4 parálogos. Se desconoce hasta el momento qué impacto tienen en la interacción *P. infestans*-hospedante estas diferencias tanto en perfiles de expresión como a nivel de la secuencia aminoacídica, entre los distintos miembros de la misma familia. Por otro lado, ninguno de estos efectores presenta una fenilalanina en la posición 69, una sustitución que ha sido descrita como esencial para evadir el reconocimiento por Rpi-*blb2* (Oh et al., 2009).

Dentro de la familia de *AVR2*, identificamos la expresión de los dos efectores canónicos de esta familia (*PITG_08943* y *PITG_22870*), los cuales han sido previamente reportados como reconocidos por R2. Ambos muestran niveles de expresión muy similares en todos los tiempos medidos, presentando perfiles casi indistinguibles (Figura 34).



Figura 33. Alineamiento de secuencias de los parálogos de AVRblb2 en PiNSL-19. Alineamiento de la región madura (posterior al motivo RxLR) de los parálogos de AVRblb2 identificados en el transcriptoma de *P. infestans* PiNSL-19. Se muestran los genes detectados en este aislamiento junto con la variante PITG_20303, la cual está ausente en PiNSL-19 (marcada en rojo). El aminoácido recuadrado en rojo es la posición clave donde una fenilalanina determina el quiebre de la resistencia mediada por Rpi-blb2.

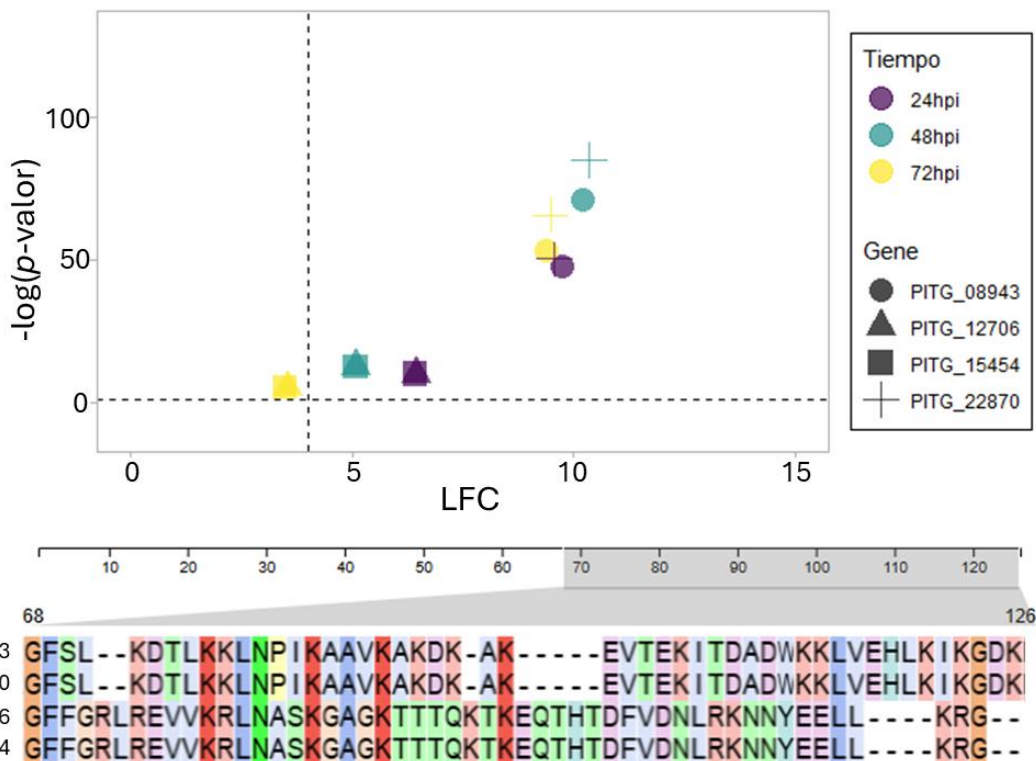


Figura 34. Expresión diferencial y alineamiento de secuencias de los parálogos de AVR2 en PiNSL-19. (Arriba) Volcano plot mostrando la expresión diferencial de los genes de la familia AVR2 en PiNSL-19 a 24, 48 y 72 horas post-inoculación (hpi) en *Solanum tuberosum* var. Spunta. El eje x representa el log2 Fold Change (LFC), mientras que el eje y indica el $-\log_{10}$ del valor de p . La forma de los puntos representa a cada gen expresado y el color diferencia los distintos tiempos de infección. (Abajo) Alineamiento de la región madura de los genes de la familia AVR2 expresados en PiNSL-19. La barra superior indica la posición relativa de los residuos dentro de la secuencia proteica.

Además, detectamos la expresión *in planta* de otros dos efectores de esta familia (*PITG_12706* y *PITG_15454*), cuyas secuencias aminoacídicas divergen significativa respecto a *PITG_08943* y *PITG_22870*. No se conoce a la fecha si estos efectores pueden ser reconocidos por R2, o si presentan funciones conservadas respecto a las ya descritas para los efectores canónicos AVR2.

Validación de datos de expresión génica obtenidos por *RNA-Seq* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Con el objetivo de validar los resultados observados en el experimento de *RNA-seq*, seleccionamos un panel de genes representativos de *P. infestans* para estudiar el perfil de expresión *in planta* a lo largo de la infección mediante RT-qPCR. Para esto, diseñamos *primers* para amplificar los transcritos correspondientes a los genes *AVR2*, *AVR3a*, *AVRblb1*, *PITG_04339* y *PITG_09173*. A su vez, diseñamos *primers* para amplificar el transcrito correspondiente al factor de elongación 2B, utilizado como gen *housekeeping*. Los experimentos de RT-qPCR se realizaron por triplicado, calculando el LFC para cada gen y cada tiempo evaluado. La comparación de los valores de LFC entre ambas metodologías mostró una fuerte correlación positiva entre los datos del análisis transcriptómico y los resultados de los ensayos de RT-qPCR. ($R^2 = 0.93$) (Figura 35).

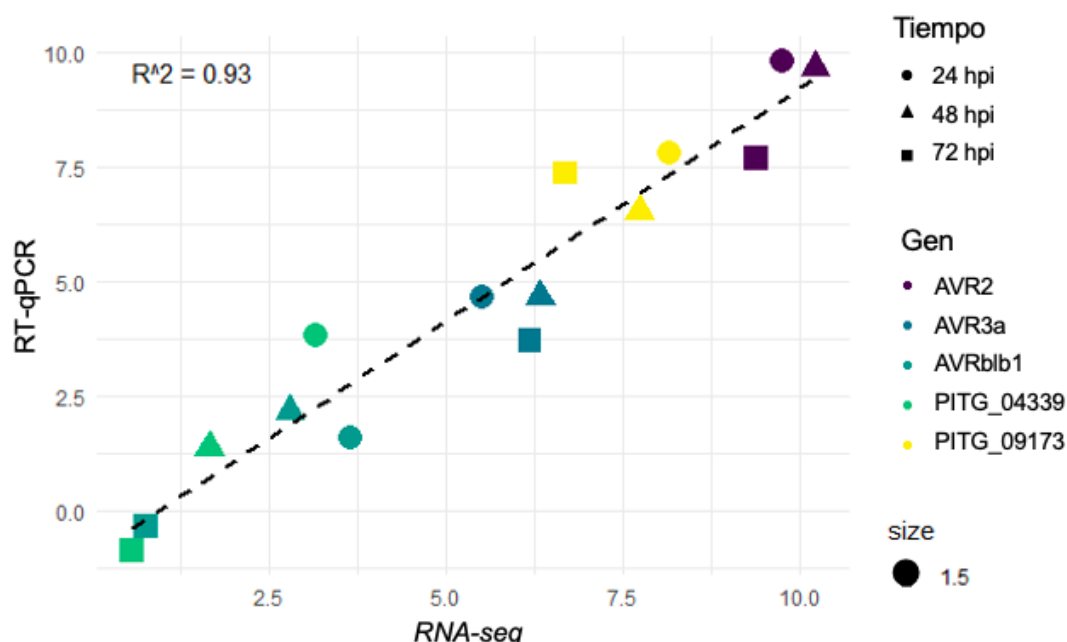


Figura 35 Regresión entre datos de expresión diferencial por *RNA-seq* (eje x) y RT-qPCR (eje y). El color representa el gen observado y la forma el tiempo en el que fue tomada la medición. Para la RT-qPCR, se utilizó como gen *housekeeping* el factor de elongación 2a.

Identificación *de novo* de efectores en el transcriptoma de PiNSL-19

Con el objetivo de identificar efectores tipo RxLR novedosos en PiNSL-19 respecto al genoma de referencia T30-4, seleccionamos las lecturas que no habían mapeado del transcriptoma de PiNSL-19 y las ensamblamos en *contigs* utilizando la herramienta de ensamblado RNA-SPADES. Posteriormente, exploramos los *contigs* ensamblados buscando marcos de lectura abiertos (utilizando el software transdecoder). Este análisis produjo una colección de 319 ARNs codificantes potenciales. Un escrutinio adicional de estos transcritos implicó la predicción de señales de secreción utilizando la herramienta signal-P, revelando 39 polipéptidos con péptidos señal predichos. Posteriormente, sometimos a este subconjunto de polipéptidos a un escrutinio adicional dirigido a identificar el motivo RxLR, situado entre las posiciones de aminoácidos 30 a 60, luego del sitio de procesamiento del péptido señal (Zhang et al., 2020) (Figura 36).

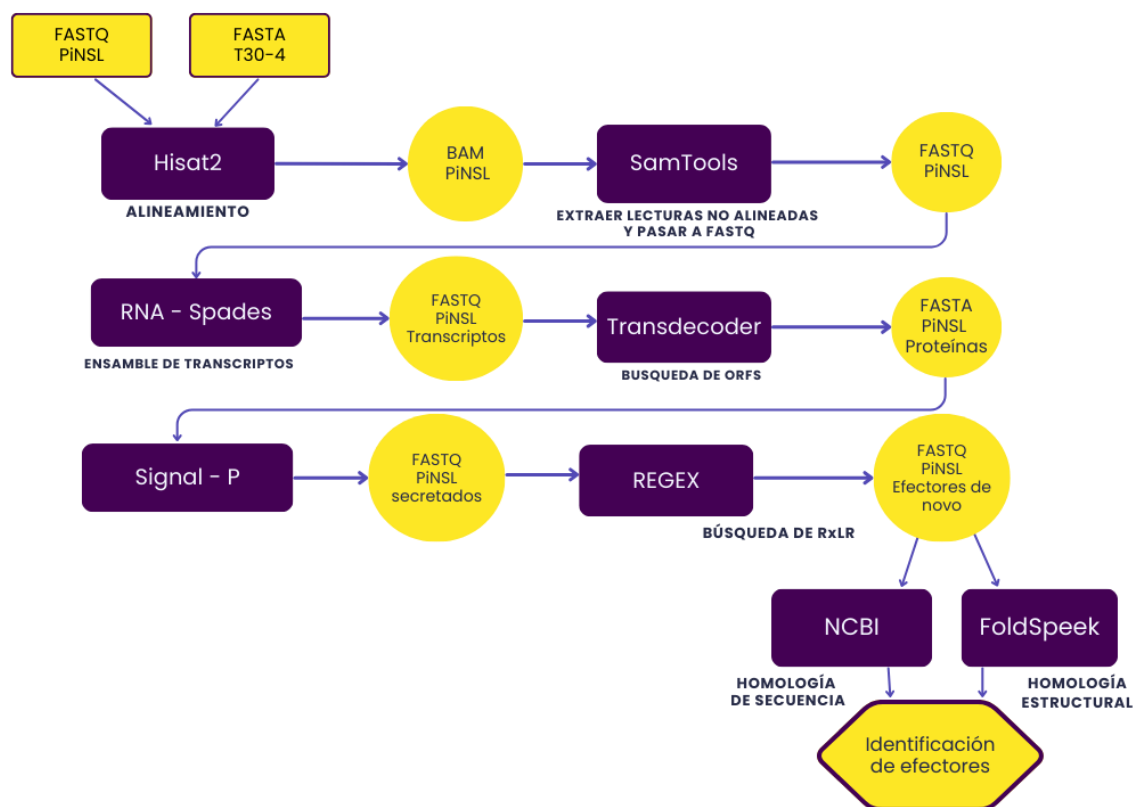


Figura 36. Predicción de efectores *de novo* en PiNSL-19. Diagrama de flujo del pipeline utilizado para la identificación de efectores en *P. infestans* PiNSL-19. Se parte de datos de secuenciación (FASTQ) del aislamiento y el genoma de referencia T30-4. Se alinean las lecturas con Hisat2 y las no alineadas se extraen con SamTools. Luego, se realiza el ensamblado de transcritos con RNA-Spades y la predicción de marcos de lectura abiertos (ORFs) con Transdecoder. Los genes con señales de secreción se identifican con Signal-P y la detección de efectores tipo RxLR se realiza mediante Regex. Finalmente, se comparan las secuencias obtenidas con bases de datos de homología de secuencia (NCBI) y estructura (FoldSeek) para la identificación de efectores putativos.

Este análisis resultó en cinco genes que codifican efectores tipo RxLR presentes en PiNSL-19 y ausentes en T30-4. Mediante búsqueda en bases de datos identificamos para dos de estos candidatos 100% de homología de secuencia con efectores ya reportados en aislamientos de *P. infestans* coreanos y que definiremos como RxLR1 y RxLR2 (Lee et al., 2020), mientras que los tres restantes (definidos RxLR3 a 5) se alinearon con otros efectores RxLR dentro del género *Phytophthora*, mostrando similitudes de secuencia que varían del 60% al 70%.

Dada la limitada información obtenida de bases de datos de secuencias para estos efectores ensamblados, utilizamos FoldSeek (Van Kenpen et al., 2024) para modelar y alinear sus estructuras proteicas predichas, con el objetivo de inferir posibles funciones o anotaciones mediante alineamiento estructural. Con este enfoque, identificamos la siguiente información para estos transcritos:

- RxLR1: En bases de datos de secuencias de NCBI se identifica este efector con 100% de homología respecto de la secuencia KAF4041695 caracterizada como “RxLR containing protein”. El alineamiento estructural muestra una conservación en la estructura muy consistente (TM-Score = 0.87015) con el efector de *Phytophthora palmivora* PHPALM_37873. No existen mayores descripciones de este efector (Figura 38).
- RxLR2: polipéptido alineado con 100% homología de secuencia con KAF4040466, un efector de *P. infestans* descrito en el mismo *data set* que RxLR1 y caracterizado como “RxLR protein containing WY”. En bases de datos de estructuras este efector es particularmente interesante dado que guarda homología estructural considerable (TM-score 0,66882) con Pex-RD18, efector de *P. infestans*. Casi la totalidad de la secuencia de RxLR2 corresponde estructuralmente con aquella comprendida entre los aminoácidos 293 a 348 de Pex-RD18, cubriendo estas posiciones aquellas que corresponden al dominio WY5 y WY6 de este efector (Figura 37).

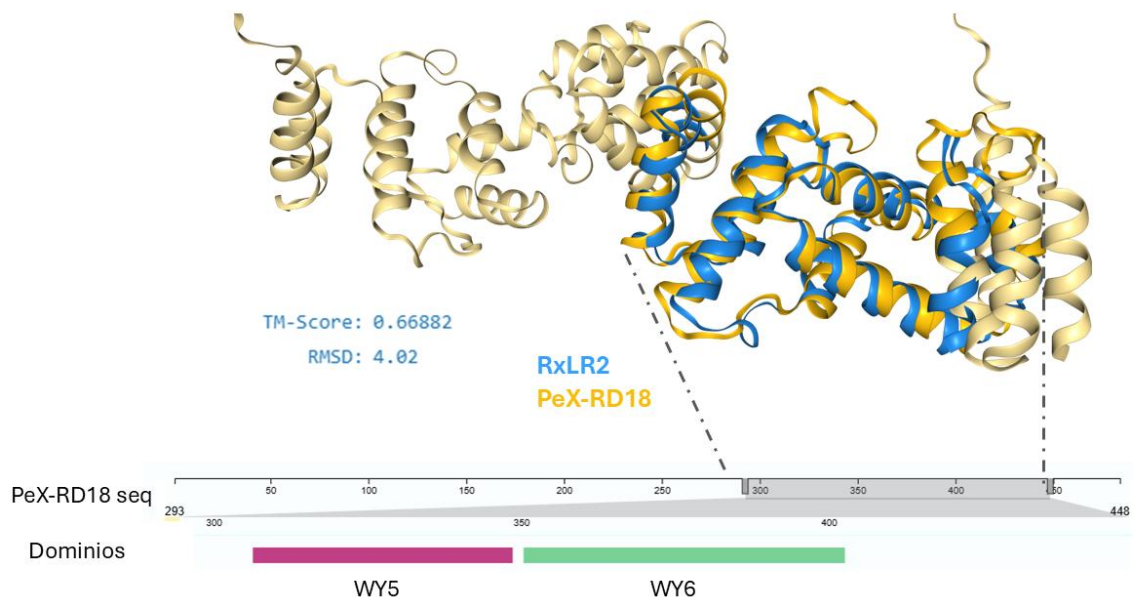


Figura 37. Homología estructural de RxLR2 con dominios WY del efector Pex-RD18. Superposición estructural entre el efector RxLR2 (azul) de PiNSL-19 y el efector Pex-RD18 de *P. infestans* (amarillo), mostrando la similitud en su arquitectura proteica. El valor de *TM-Score* (0.66882) indica una homología estructural significativa, sugiriendo posibles similitudes funcionales entre ambas proteínas. En la parte inferior, se representa el esquema de Pex-RD18 con la localización de los dominios WY5 y WY6.

- RxLR3: Esta proteína putativa conserva un 66.3% de homología de secuencia aminoacídica con *PITG_22798*. La descripción de este efector (Wang *et al.*, 2017) sugiere que está relacionado a la inducción de necrosis y que tiene una señal de localización nuclear en una región con la que comparte homología estructural con RxLR3. (Figura 41)
- RxLR4 y 5: No logramos obtener información confiable del alineamiento estructural ($TM\text{-score} < 0,3$) ni homología de secuencia en ninguna de las bases de datos utilizadas.

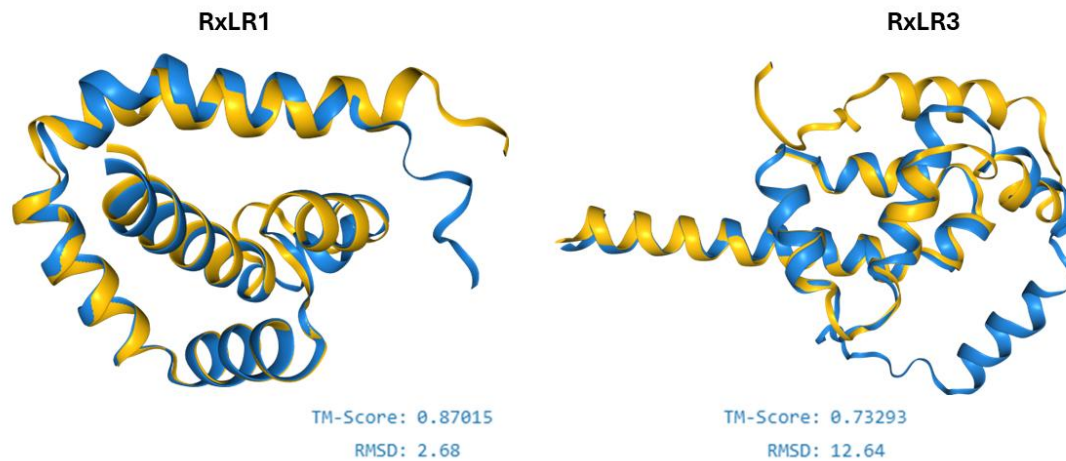


Figura 38. alineamiento estructural de los efectores RxLR1 y RxLR3 de PiNSL-19. Superposición de las estructuras predichas de los efectores RxLR1 y RxLR3 (azul) con sus proteínas homólogas (amarillo). (*Izquierda*) RxLR1 muestra una alta similitud estructural ($TM\text{-Score} = 0.87015$, $RMSD = 2.68$) con un efector de *Phytophthora palmivora* (PHPALM_37873), aunque su función sigue sin caracterizarse. (*Derecha*) RxLR3 presenta un menor grado de conservación estructural ($TM\text{-Score} = 0.73293$, $RMSD = 12.64$) con PITG_22798, un efector asociado a la inducción de necrosis y con una posible señal de localización nuclear (Wang et al., 2017).

Capítulo III:

Evaluación de la agresividad de aislamientos de
P. infestans en variedades comerciales de papa y líneas
Transgénicas de *Nicotiana benthamiana*

Respuesta de las variedades de papa Spunta, Kennebec e Innovator a aislamientos argentinos de *P. infestans*.

Agresividad medida a través del área de lesión

Como se mencionara anteriormente, el mercado Argentino de papa fresca está dominado por la variedad Spunta, siendo otras variedades de relevancia comercial Innovator y Kennebec. Con el objetivo de evaluar el comportamiento de estas tres variedades frente a aislamientos argentinos de *P. infestans*, realizamos ensayos de infección en hoja desprendida utilizando los aislamientos PiNSL-19, Tafi, Cba2 y Ar20079, obtenidos de 4 de las principales regiones productivas de papa del país (Figura 39). Para ello inoculamos hojas desprendidas de plantas crecidas 5 semanas en condiciones de invernadero, y las inoculamos con 10ul de suspensiones de zoosporas (20000/ 30000 zoosporas/ml). Fotografiamos las hojas 5 días post inoculación en cámaras agar-agua, Las imágenes se analizaron con el paquete de R “pliman” para obtener el porcentaje de hoja lesionada.

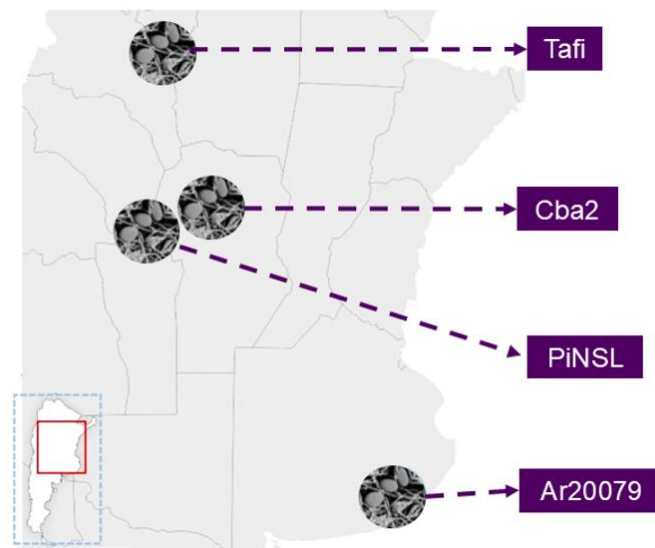


Figura 39: Ubicación geográfica de los aislamientos de *Phytophthora infestans* en Argentina. Mapa de Argentina indicando la procedencia de los aislamientos utilizados en los ensayos: Tafi (Tafí del Valle, Tucuman), Cba2 (Montecristo, Cordoba), PiNSL (Candelaria, San Luis) y Ar20079 (Balcarce, Buenos Aires). Las localidades representadas corresponden a diferentes regiones productivas del país.

No observamos diferencias en el fenotipo de infección (área lesionada y aspecto de la lesión) en las variedades Spunta y Kennebec, para ninguno de los aislamientos evaluados, resultando todas las interacciones compatibles (Figura 40). Sorpresivamente, sí encontramos diferencias en la respuesta de la variedad Innovator frente a los distintos aislamientos de *P. infestans*. Pudimos observar que la interacción resultó incompatible con los aislamientos PiNSL-19 y Cba2, y compatible con los aislamientos Tafi y Ar20079 (Figura 40 y 41).

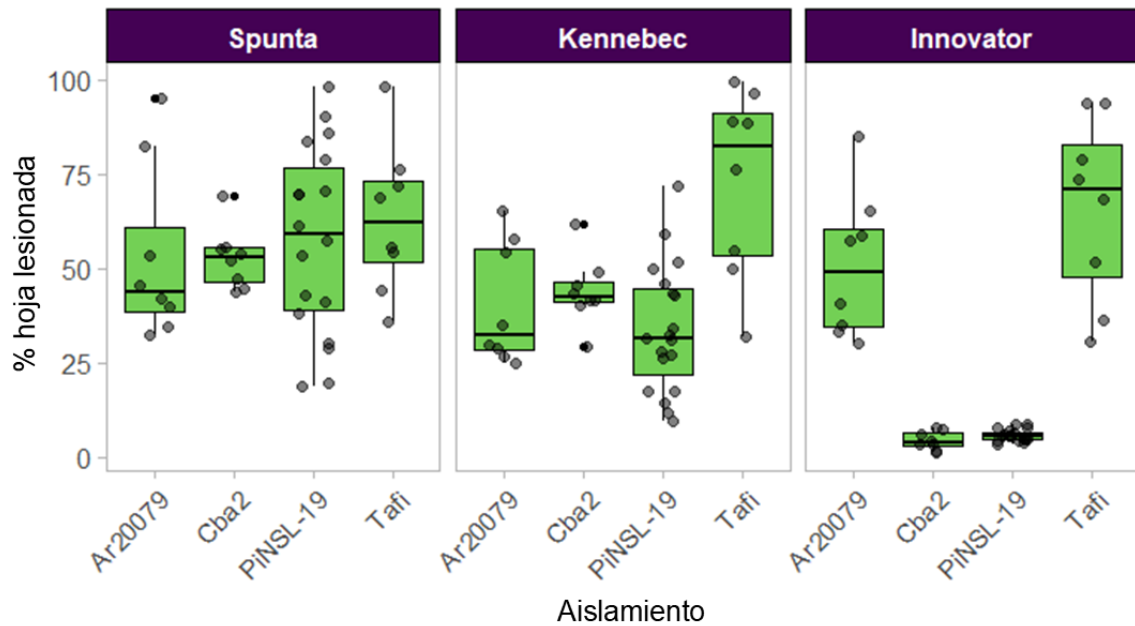


Figura 40: Evaluación de la susceptibilidad de variedades comerciales de papa frente a aislamientos argentinos de *P. infestans*. Boxplots que representan el porcentaje de tejido lesionado en ensayos de infección en hoja desprendida de las variedades de papa *Spunta*, *Kennebec* e *Innovator* frente a los aislamientos PiNSL-19, Ar20079, Cba2 y Tafi.

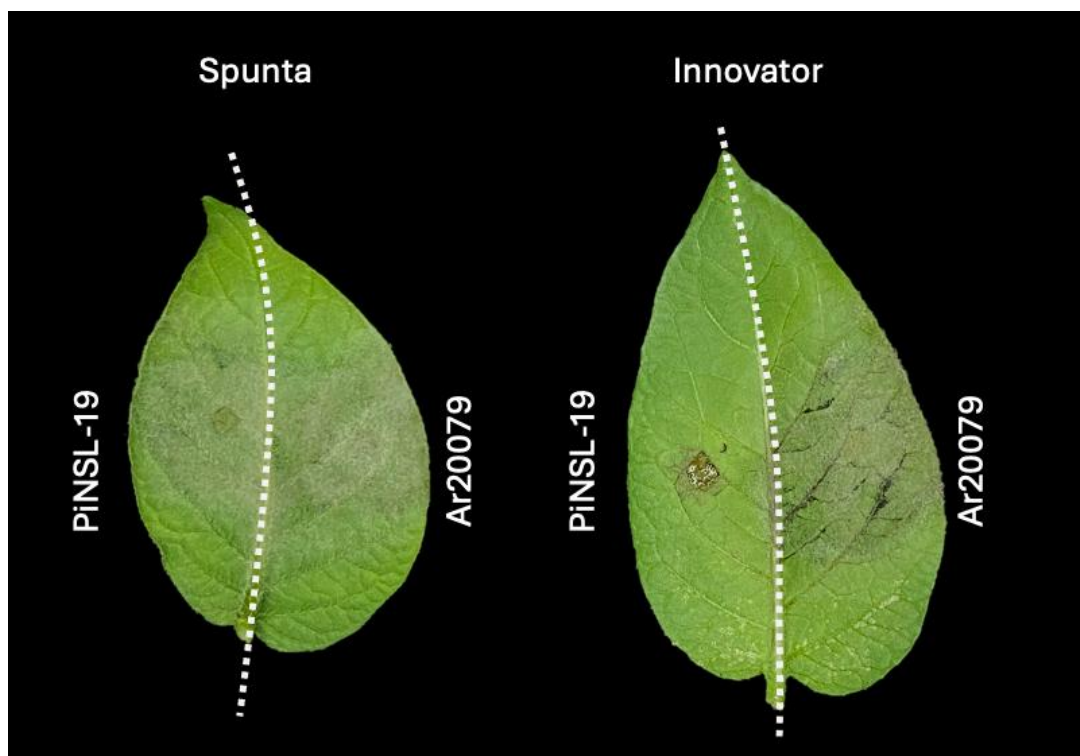


Figura 41: Esquema de la inoculación de hojas de *S. tuberosum* variedades Innovator y Spunta con los aislamientos Ar20079 y PiNSL-19. Las hojas fueron inoculadas con gotas de 10 μ L de una suspensión de zoosporas en la cara abaxial. A la izquierda de la nervadura central se inoculó PiNSL-19 y a la derecha Ar20079. Las fotos fueron tomadas 5 dpi.

Agresividad medida por producción de esporangios

Para evaluar otro aspecto de la virulencia en los aislamientos que mostraron una respuesta diferencial frente a Innovator (PiNSL-19 y Ar20079), realizamos ensayos de inoculación en discos de hoja de 10 mm de diámetro para cuantificar la producción de esporangios de estos aislamientos en las variedades Spunta e Innovator. Realizamos los ensayos en placas de 24 pocillos conteniendo agar-agua incluyendo 12 discos de cada variedad por placa. 6 discos de cada variedad se inocularon con Ar20079 y 6 con PiNSL-19 (Figura 42). Al cabo de 48, 60, 72, 84 y 96 horas post inoculación, contabilizamos la cantidad de esporangios producidos por disco de hoja en cámara de Neubauer.

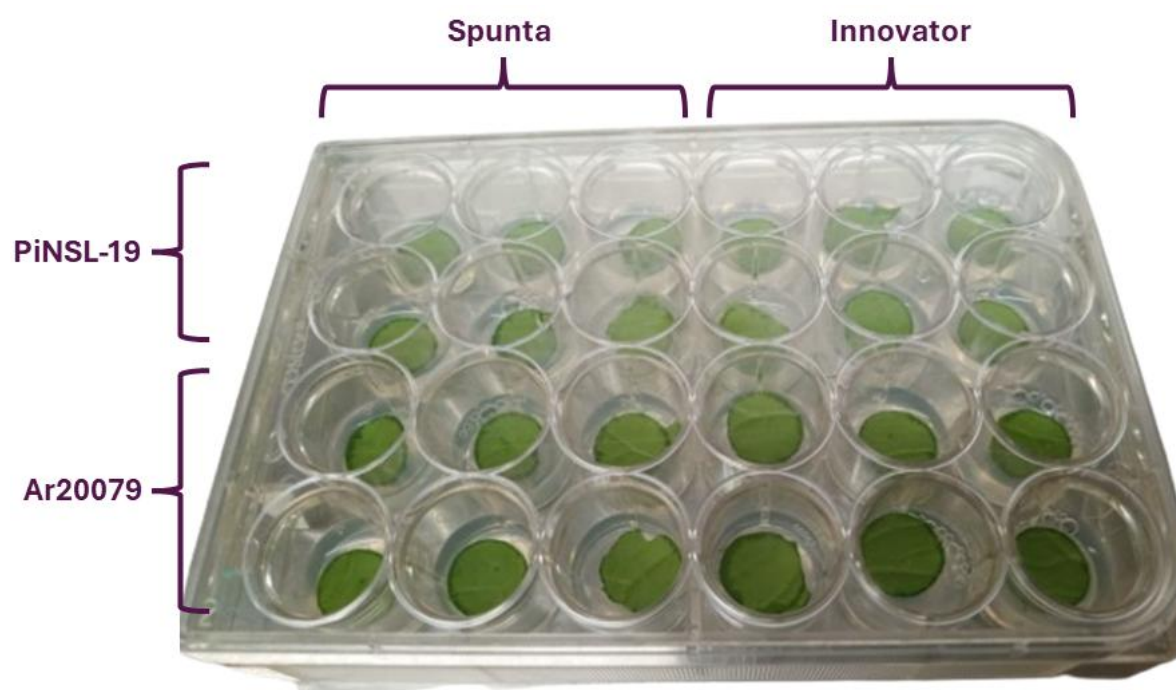


Figura 42: Diseño experimental para la cuantificación de esporulación de *P. infestans* en variedades de papa. Placa de 24 pocillos utilizada en los ensayos de agresividad, evaluando la producción de esporangios en discos foliares de las variedades *Spunta* e *Innovator* tras la inoculación con los aislamientos PiNSL-19 y Ar20079. Se destinaron tres columnas para cada variedad y dos filas para cada aislamiento, obteniendo un total de seis réplicas por condición en cada placa.

Como observamos con el área de lesión, la producción de esporangios de PiNSL-19 en Innovator se vio fuertemente reducida, mientras que Ar20079 mostró una mayor capacidad de esporulación en esta variedad, confirmando su virulencia. En contraste, en la variedad Spunta, Ar20079 comenzó a esporular más rápido que PiNSL-19, observándose diferencias significativas entre ambos aislamientos a las 60 hpi, esta detección de esporulación más temprana podría tener impacto en la agresividad diferencial entre estos aislamientos, ya que implica que tras 60 horas Ar20079 ya podría estar produciendo inóculo mientras que en PiNSL

no se observa hasta las 72 horas. Sin embargo, tras este tiempo, no se detectaron diferencias significativas en la producción de esporangios entre los aislamientos en Spunta. (figura 43).

El análisis de infección en variedades comerciales de papa mostró que *Spunta* y *Kennebec* son susceptibles a todos los aislamientos evaluados, mientras que *Innovator* presentó una respuesta diferencial según el aislamiento, mostrando resistencia a PiNSL-19 y Cba2, pero susceptibilidad a Ar20079 y Tafi. Este hallazgo sugiere la presencia de factores genéticos en *Innovator* que podrían conferir resistencia específica frente a ciertos aislamientos, lo que abre nuevas líneas de investigación para caracterizar los mecanismos involucrados. En conjunto, estos resultados contribuyen a la selección de genes de resistencia y variedades con potencial para la mejora genética de la papa en Argentina, reforzando la importancia de estudios poblacionales y funcionales de *P. infestans* en contextos locales.

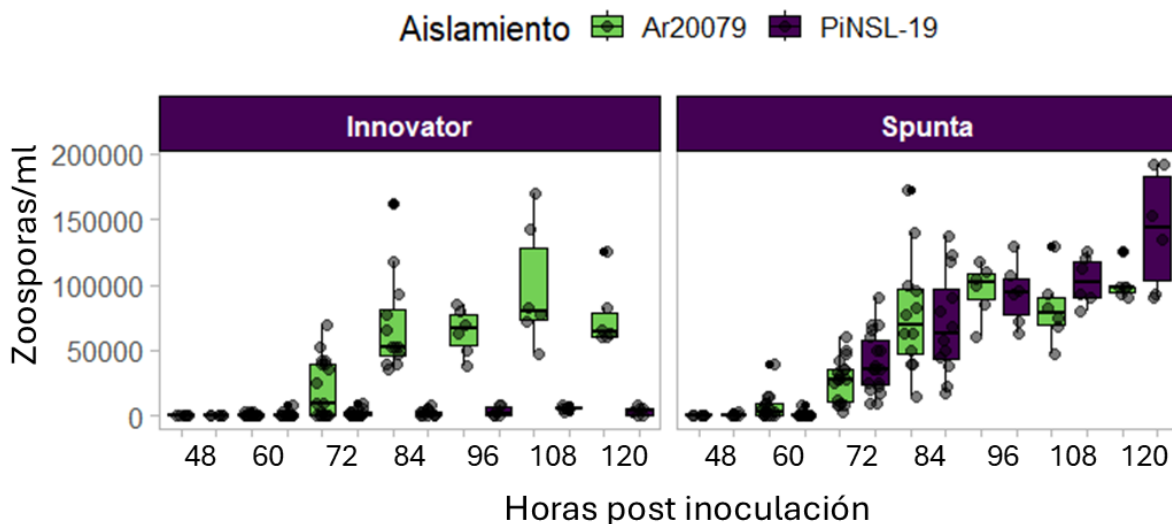


Figura 43: Cuantificación de esporulación de *Phytophthora infestans* en variedades de papa a lo largo del tiempo. Boxplots que representan el conteo de esporangios por disco de hoja en las variedades *Innovator* y *Spunta* a diferentes horas post infección (hpi) con los aislamientos Ar20079 y PiNSL-19. Cada punto representa una réplica individual, mientras que los colores indican el aislamiento inoculado.

Respuesta de plantas transgénicas de *N. benthamiana* expresando genes *R* a aislamientos argentinos de *P. infestans*.

La incorporación de genes *R* en variedades de interés comercial es una aproximación interesante para el control del tizón tardío. En colaboración con el Lic. Juan Azcue, nos propusimos evaluar, como parte de su trabajo de Tesis de Licenciatura, el potencial de los receptores inmunes *R1*, *R3a*, *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1* y *Rpi-amr3* para conferir resistencia frente a

aislamientos argentinos de *P. infestans* identificados durante este Trabajo del Tesis Doctoral. Utilizamos líneas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan alguno de estos receptores, además de una línea control transformada genéticamente con el vector vacío (EV). Estas líneas fueron gentilmente cedidas por los Prof. Jonathan Jones y Sophien Kamoun (TSL, Norwich, Reino Unido). Inoculamos hojas desprendidas de cada línea transgénica, con 4 aislamientos de *P. infestans* representativos de las diferentes regiones productivas (Figura 44).

Las infecciones se hicieron inoculando dos gotas de 10ul de suspensiones de zoosporas (50000 zoosporas/microlitro) por hoja, y las hojas se incubaron en placas altas de agar-agua, para ser fotografiadas 6 días post inoculación (Figura 45). Las imágenes se analizaron con el paquete de R “pliman” para obtener el porcentaje de hoja lesionada.

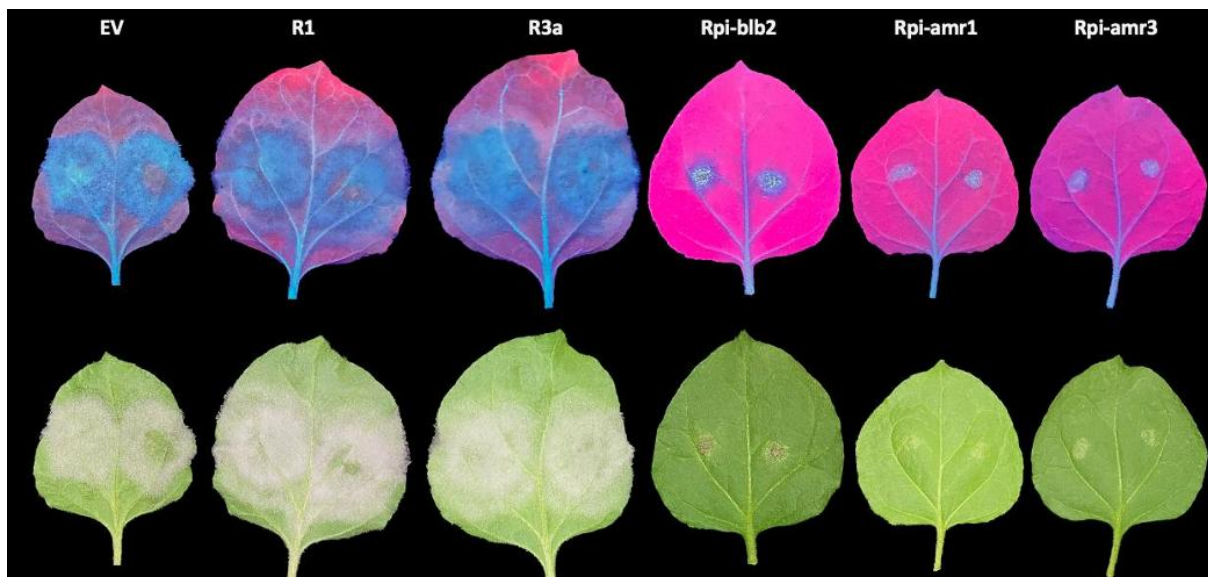


Figura 44: Líneas transgénicas de *N. benthamiana* infectadas con PiNSL-19. Hojas de líneas transgénicas de *N. benthamiana* infectadas con PiNSL-19, a los 6 dpi. Se indica arriba de cada hoja el gen R incorporado en cada línea transgénica. Arriba, fotografía bajo luz UV (365 nm). Abajo, las mismas hojas fotografiadas con luz blanca.

En la figura 48 se muestran los resultados de estos experimentos de infección mediante la representación en box plots de la variable respuesta (% de infección) en función de las líneas de *N. benthamiana*. Las líneas que expresan los genes de resistencia *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1* y *Rpi-amr3* presentaron un menor porcentaje de área lesionada para todos los aislamientos testeados, respecto de las plantas EV. En cambio, las plantas que expresan *R1* o *R3a* fueron indistinguibles del control.

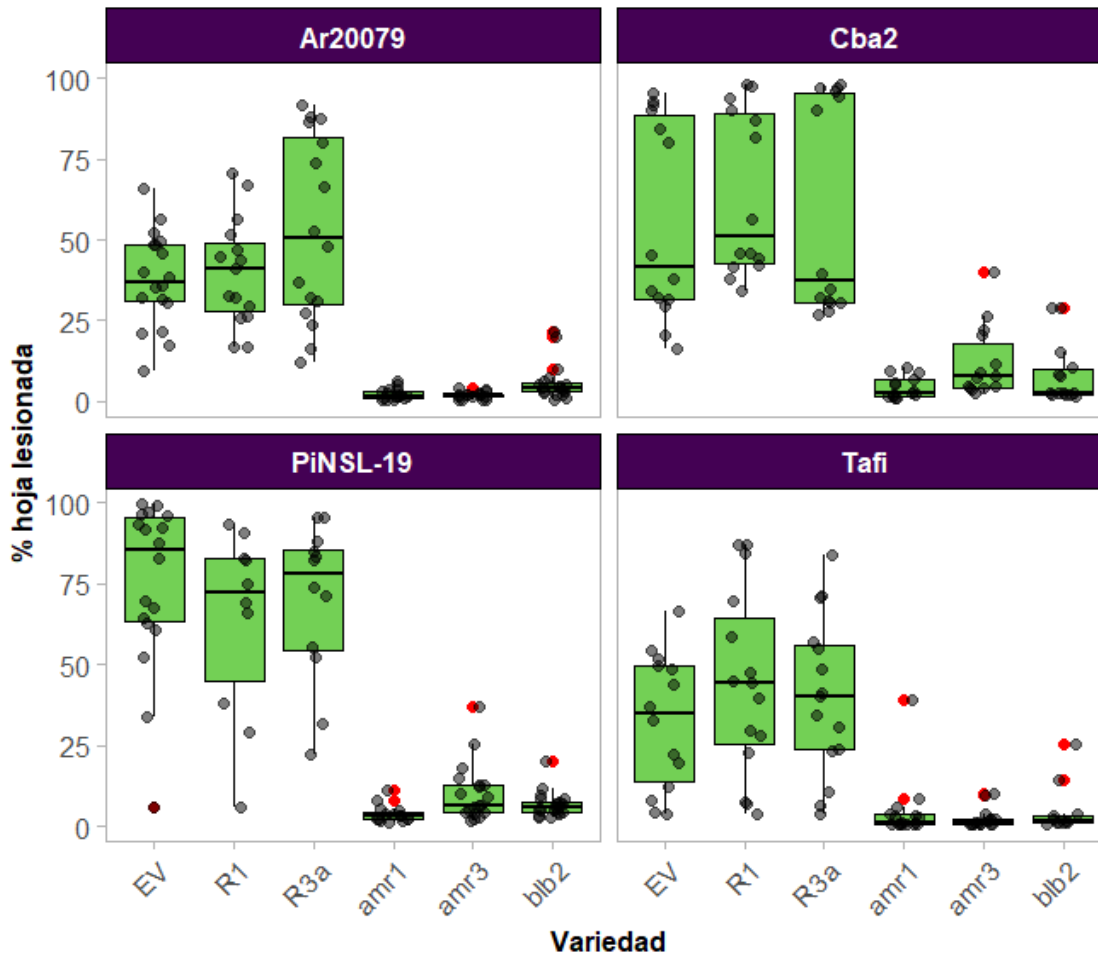


Figura 45: Evaluación de la resistencia de *N. benthamiana* transgénicas frente a aislamientos argentinos de *P. infestans*. Boxplots que representan el porcentaje de hoja lesionada en líneas transgénicas de *N. benthamiana* expresando diferentes genes de resistencia (*Rpi-R1*, *Rpi-R3a*, *Rpi-amr1*, *Rpi-amr3*, *Rpi-blb2*) y en un control transformado con vector vacío (EV). Se muestran los resultados obtenidos para los aislamientos Ar20079, Cba2, PiNSL-19 y Tafi.

Si bien los aislamientos argentinos, como definimos previamente, son distintos representantes de un linaje clonal prevalente en la región, observamos diferencias de medias entre aislamientos, estableciéndose dos grupos. PiNSL-19 y Cba2 muestran una media más alta de % de hoja lesionada en las líneas de *N. benthamiana* (Figura 46, arriba). Aunque no hemos logrado establecer diferencias en los aislamientos respecto de las líneas en particular (Figura 46, abajo). El crecimiento del patógeno en todos los casos se vió limitado por la incorporación de los receptores inmunes *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1* y *Rpi-amr3*.

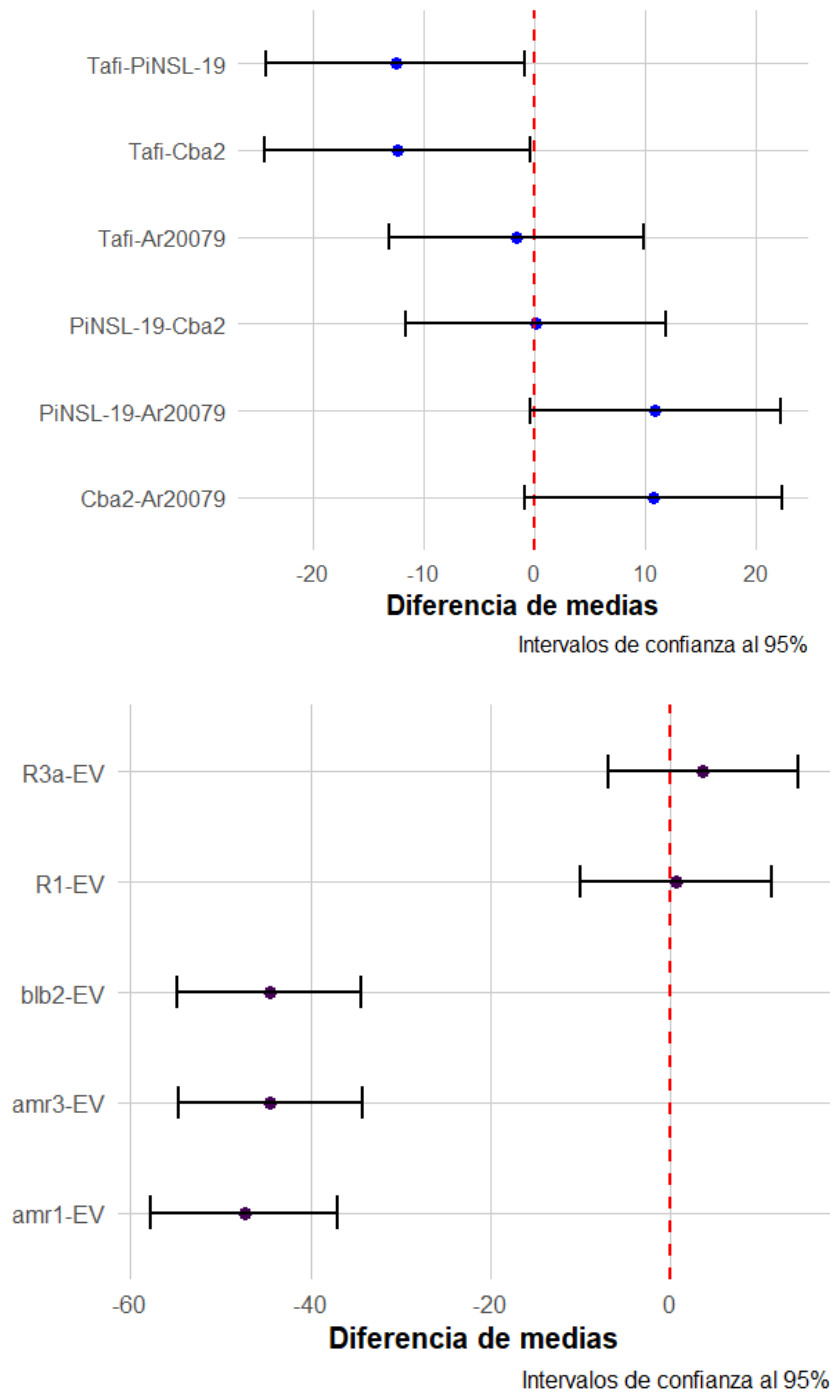


Figura 46 Análisis de diferencias de medias en la resistencia de *N. benthamiana* y la agresividad de aislamientos de *P. infestans*. (arriba) Diferencia de medias con intervalos de confianza del 95% en la respuesta de las distintas líneas transgénicas de *N. benthamiana* frente a los aislamientos PiNSL-19, Cba2, Ar20079 y Tafi. Se observa que las líneas que expresan *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1* y *Rpi-amr3* presentan una reducción significativa en el porcentaje de hoja lesionada en comparación con el control (EV). (abajo) Diferencia de medias con intervalos de confianza del 95% en la agresividad de los distintos aislamientos de *P. infestans*. Se establecen diferencias significativas entre aislamientos, agrupándose en dos niveles de agresividad. Las comparaciones por pares fueron realizadas mediante pruebas *post hoc* de Tukey.

También analizamos los niveles de expresión de los efectores reconocidos por los receptores inmunes evaluados en este estudio. Encontramos que todos los efectores, excepto *AVR1*, se expresan durante la infección en plantas de Spunta (Figura 47). En particular, *AVR3a* se expresa en su variante EM, lo que le permite a *P. infestans* evadir la resistencia mediada por *R3a*. Los demás efectores mostraron perfiles de expresión disímiles entre sí, pero todos fueron detectados in planta, sugiriendo que podrían ser reconocidos por los receptores correspondientes. Es importante destacar que estos datos provienen de un análisis de *RNA-seq* realizado en Spunta y no en las líneas transgénicas de *N. benthamiana*, por lo que sería necesario continuar estos estudios en las plantas utilizadas en los ensayos de infección.

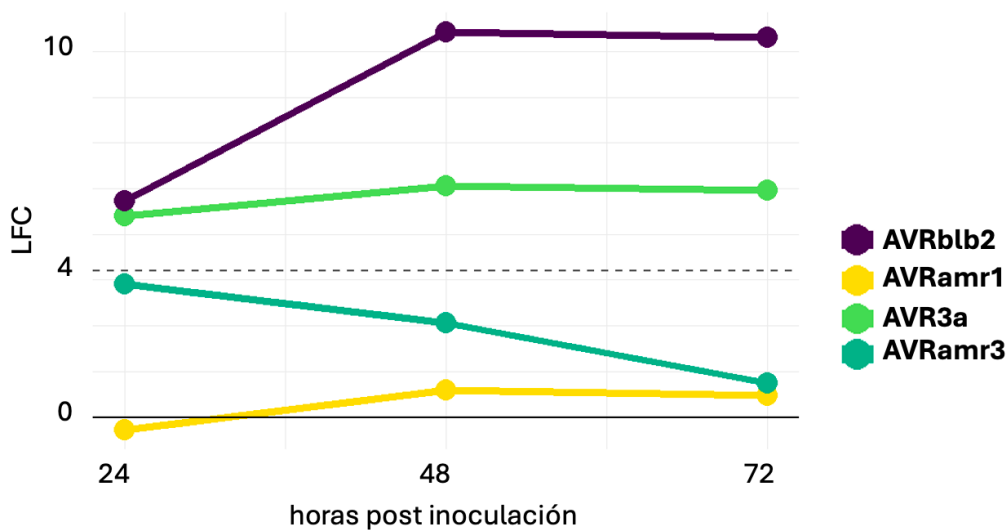


Figura 47 Expresión diferencial de efectores de PiNSL-19 durante la infección de Spunta. Expresión de los genes *AVR-amr1*, *AVR-amr3*, *AVR-blb2* y *AVR3a* en el aislamiento PiNSL-19, medida mediante *RNA-seq* a las 24, 48 y 72 horas post infección en plantas de papa Spunta. El eje Y representa el cambio en la expresión en \log_2 fold change, mientras que el eje X indica el tiempo post infección en horas. Cada línea de color corresponde a un efector específico, según la leyenda situada en la parte superior derecha de la figura.

DISCUSIÓN

En Argentina, donde al menos el 80 % de la superficie cultivada con papa está compuesta por variedades susceptibles al tizón tardío, es crucial comprender la dinámica y las particularidades de la población de *P. infestans* en cada región productiva. Este conocimiento es clave para un manejo eficaz de la enfermedad e imprescindible para orientar programas de mejoramiento que promuevan estrategias de resistencia duraderas y sostenibles.

En esta Tesis Doctoral, estudiamos la diversidad poblacional de *P. infestans* en Argentina y, por primera vez en el país, caracterizamos a nivel genómico y a nivel de transcriptoma, un representante de su linaje prevalente. Además, profundizamos en el análisis de un repertorio de proteínas secretadas durante la interacción con la variedad Spunta, consideradas clave para el desarrollo de estrategias de mejoramiento del cultivo.

Los estudios sobre las poblaciones de *P. infestans* en Sudamérica han revelado un aumento desde 2007 hasta la fecha en la prevalencia del linaje EU_2_A1, al que corresponden todos los aislamientos muestreados en Argentina para este trabajo (Lucca & Huarte, 2011; esta Tesis). Si bien el tamaño poblacional analizado en este estudio es limitado y no permite descartar la presencia de otros linajes en competencia, es destacable que EU_2_A1 tenga una prevalencia suficiente como para haber sido el único detectado en distintas regiones del país. La vigilancia del patógeno mediante muestreos en los focos de infección a lo largo de diferentes campañas es fundamental para un adecuado seguimiento de las poblaciones de *P. infestans*, así como para registrar eventos de migración y el desplazamiento de linajes prevalentes.

A pesar de su origen europeo, el linaje EU_2_A1 fue desplazado de Europa hace décadas, lo que sugiere que su distribución global está influenciada por factores ecológicos y evolutivos complejos. Su persistencia en otras regiones, como Sudamérica, podría estar relacionada con diferencias en las condiciones ambientales, la presión de selección ejercida por el manejo del cultivo o la ausencia de competencia con otros linajes más agresivos. Además, los flujos migratorios impulsados por el comercio han sido un factor clave en la dispersión de *P. infestans*, facilitando la introducción y el establecimiento de linajes en nuevas regiones (Fry *et al.*, 2015; Guha Roy *et al.*, 2021; Du *et al.*, 2018; Njoroge *et al.*, 2019).

El genotipo EU_2_A1 está actualmente presente en Uganda, Tanzania, Kenia, Ruanda, Burundi (Ghislain *et al.*, 2018; Njoroge *et al.*, 2019), Rusia (Sokolova *et al.*, 2015), Brasil, Chile (M.F. Lucca, comunicación personal), Indonesia (Dangi *et al.*, 2021), Argelia (Saville *et al.*, 2021), y Argentina (Lucca & Huarte, 2011; esta Tesis).

En Argentina, el avance de EU_2_A1 se detectó por primera vez en 2010 (Lucca & Huarte, 2011). Previo a esto hay un registro de Forbes y col., (1998) donde identifican cinco

linajes argentinos con el tipo de apareamiento A2. Si bien puede haber aparecido reproducción sexual tras el ingreso de EU_2_A1, no obtuvimos datos que sugieran esto. Los aislamientos analizados muestran evidencias de clonalidad entre ellos y PiNSL-19 presenta un genoma triploide, ambos indicativos de reproducción asexual (Knaus et al., 2020).

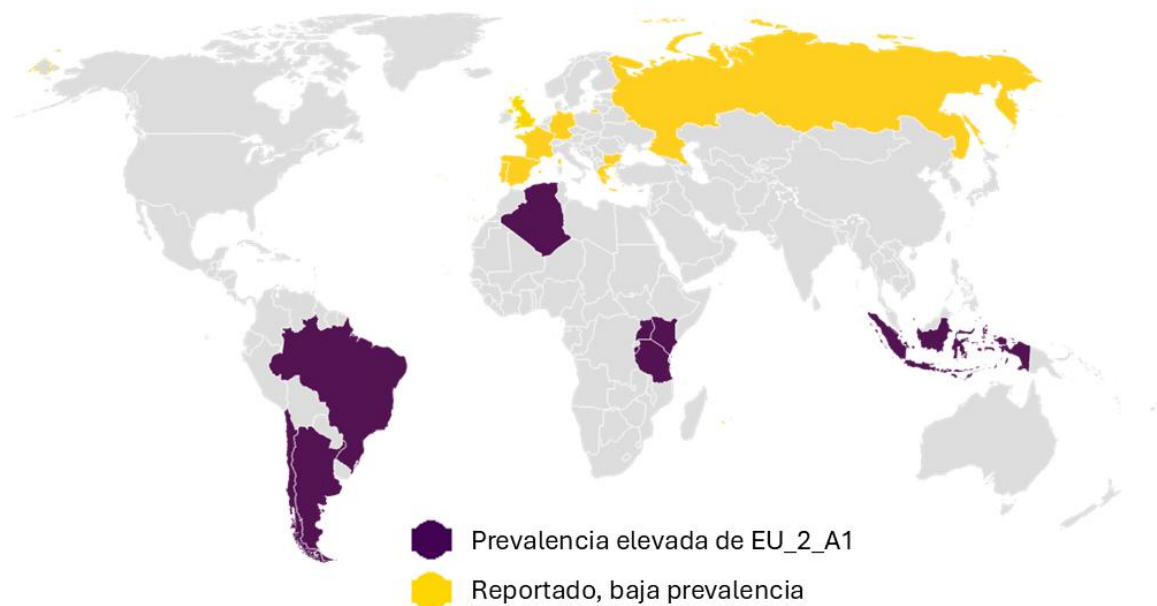


Figura 48. Distribución geográfica del GLM EU_2_A1 de *P. infestans* reportados en diferentes regiones del mundo. Mapa global que muestra la presencia del GLM EU_2_A1 de *P. infestans*. Los países resaltados en **morado** representan regiones donde se ha identificado en los últimos 10 años la presencia de este GLM en una proporción significativa de la población, mientras que los países en **amarillo** indican otras áreas donde se ha reportado el GLM, pero sólo ocasionalmente. Fuente: Euroblight y revisión bibliográfica. Creado con Datawrapper.

Todos los aislamientos analizados pertenecen a un mismo linaje clonal y, en comparación con muestras europeas del mismo GML, las muestras argentinas forman un clúster diferenciado dentro de este grupo. Estos resultados sugieren que la población de *P. infestans* en Argentina sigue un modelo de estructura simple, dominado por el GML EU_2_A1, similar a lo observado en otras regiones del mundo.

Nuestra investigación aporta información fundamental sobre el linaje EU_2_A1 de *P. infestans*, dominante en la producción de papa no solo en Argentina, sino también en otros países de Sudamérica y el mundo. Según la bibliografía disponible, este trabajo constituye el primer estudio a nivel de transcriptoma y genoma completo de este linaje a nivel global.

Si bien la expansión clonal del GML EU_2_A1 explica la estructura actual de la población de *P. infestans* en Argentina, la detección de lesiones significativamente más grandes en las líneas transgénicas de *N. benthamiana* de los aislamientos PiNSL-19 y Cba2 respecto de los aislamientos Ar20079 y Tafi (Figura 46), junto con la capacidad de estos últimos de infectar plantas de *S. tuberosum* var Innovator, indica la aparición de al menos dos ecotipos presentes en esta colección de aislamientos. Estas diferencias no las pudimos visualizar a partir de nuestro set de SNPs obtenidos por secuenciación de amplicones, por lo que es probable que necesitemos recurrir a metodologías con mayor resolución para establecer diferencias entre aislamientos tan similares.

En la variedad Innovator, la respuesta diferencial frente a los aislamientos de *P. infestans* evaluados es de tipo cualitativo. No se trata de que algunos aislamientos infecten más que otros, sino que, en el caso de PiNSL-19 y Cba2, se desencadena una respuesta hipersensible que limita el crecimiento del patógeno. Esta observación podría estar relacionada con polimorfismos en los efectores reconocidos por los genes *R* presentes en esta variedad de papa, ya sea a nivel de presencia/ausencia, variantes alélicas o regulación epigenética. Innovator expresa los genes *R1*, *R3b* y *R2-like* (Armstrong et al., 2018), los cuales pueden reconocer los efectores correspondientes de *P. infestans*.

El gen *R1* de *Solanum demissum* fue introgresado en numerosas variedades modernas de papa, incluidas Spunta, Kennebec, Innovator y Atlantic (Armstrong et al., 2018; Coomber et al., 2024; <https://www.europotato.org/characters>). Sin embargo, la pérdida del gen *AVR1*, documentada en diversos aislamientos de *P. infestans* (Coomber et al., 2024), ha limitado la efectividad de *R1* en el control del tizón tardío. En este trabajo de tesis demostramos que *AVR1* está ausente en PiNSL-19 y, probablemente, en los otros tres aislamientos analizados, ya que todos ellos mostraron una interacción compatible con plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan *R1*. Por lo tanto, la susceptibilidad de Spunta y Kennebec al tizón tardío podría explicarse por la ausencia de *AVR1*, dado que *R1* es el único gen *R* específico para *P. infestans* expresado en estas variedades (Armstrong et al., 2018).

En PiNSL-19, no detectamos expresión del gen *AVR3b* en los ensayos de RNA-seq. Sin embargo, el análisis genómico reveló la presencia del locus correspondiente en su genoma, con una de las dos variantes descritas hasta el momento para este gen (Gu et al., 2023). Identificamos tres mutaciones en homocigosis ubicadas a 24, 271 y 587 pares de bases río arriba del codón de inicio de *AVR3b*, las cuales podrían estar relacionadas con su silenciamiento transcripcional (Figura Suplementaria 1).

De los genes *R* presentes en la variedad Innovator que reconocen efectores de *P. infestans*, descartamos *R1* y *R3b* como responsables del fenotipo de resistencia observado

frente a PiNSL-19. Respecto a *R2-like*, pudimos observar en PiNSL-19 la expresión del efector *AVR2*, altamente inducida a 24, 48 y 72 horas post inoculación en Spunta (Figura 28). Este efector, cuyo gen presenta dos copias cercanas en el genoma (*PITG_22870* y *PITG_08943*), desencadena una respuesta hipersensible frente a *R2-like* (Yang *et al.*, 2020). En cambio *PITG_08949*, cuya secuencia es similar a la de *AVR2*, presenta un fenotipo virulento frente a plantas que expresan *R2-like* (Gilroy *et al.*, 2011). A su vez, se han identificado variantes de *AVR2* que logran escapar del reconocimiento de *R2-like* a través del desordenamiento de la proteína (Yang *et al.*, 2020). Es probable que la diferencia entre los aislamientos de *P. infestans* argentinos en la virulencia frente a la variedad Innovator resida en polimorfismos en estos locus. La secuenciación de los genes *PITG_22870*, *PITG_08943* y *PITG_08949* en Cba2, Tafi y Ar20079 podría ayudarnos a elucidar si la diferencia en la virulencia es consecuencia de polimorfismos asociados a estos loci. Será además interesante realizar experimentos de *RNA-seq* comparativos entre Spunta e Innovator con el aislamiento Ar20079.

El hecho de que Spunta, la variedad de papa más importante para consumo fresco en Argentina, presente su única resistencia al tizón tardío “quebrada” por todos los aislamientos probados, y que Innovator, una de las principales variedades utilizadas en la industria de papa procesada, tenga dos de sus tres genes de resistencia superados y un tercero frente al cual ya existen aislamientos capaces de evadir la respuesta inmune, evidencia la fuerte dependencia de los agricultores en el uso de fungicidas para el control del tizón tardío.

Surge de lo expuesto cuán fundamental resulta durante la búsqueda de soluciones a campo, relevar rutinariamente la variabilidad de la población de patógenos. A partir de los datos obtenidos del genoma y transcriptoma *in planta* en el marco de esta Tesis Doctoral, nos enfocamos en caracterizar el repertorio de efectores secretados durante la interacción con la variedad de papa Spunta. Este análisis es clave para identificar receptores inmunes potencialmente efectivos contra los aislamientos locales de *P. infestans*. Además, el estudio del ‘efectoroma’ proporciona información relevante para guiar otras estrategias de resistencia que, si bien no fueron abordadas en esta Tesis, están en evaluación para el control del tizón tardío. Entre ellas, se destacan la selección de blancos del patógeno para estrategias basadas en silenciamiento génico, como HIGS (*host-induced gene silencing*) y SIGS (*spray-induced gene silencing*) (Rodríguez Melo *et al.*, 2023; Hou & Ma, 2020), así como la identificación de genes de susceptibilidad (S) (Fabro, 2022), frecuentemente objetivos de efectores, cuya modificación mediante edición génica podría contribuir al desarrollo de cultivos más resistentes.

La expresión *in planta* de los efectores secretados por PiNSL-19 durante la interacción con Spunta permitió identificar genes *R* con potencial para un control efectivo del tizón tardío de la papa en las principales zonas productoras del país. En este sentido, las plantas

transgénicas de *N. benthamiana* que expresaban de manera independiente los genes *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1* o *Rpi-amr3* mostraron resistencia en ensayos de inoculación con los aislamientos argentinos PiNSL-19, Cba2, Ar20079 y Tafí.

Nuestros resultados muestran que en PiNSL-19 la expresión de los efectores de la familia de *AVRblb2* está restringida a un subconjunto de los genes reportados en esta familia, con patrones de expresión muy similares entre ellos durante la infección en planta. Detectamos la inducción de cuatro parálogos previamente descritos como reconocidos por *Rpi-blb2* (*PITG_04085*, *PITG_04086*, *PITG_04090* y *PITG_20300*). Además, se analizó la expresión de otros dos miembros de la familia (*PITG_18670* y *PITG_18675*), que también se encontraron inducidos con un perfil distinto que *PITG_04085*, *PITG_04086*, *PITG_04090* y *PITG_20300* pero consistente entre ellos dos. Estos dos genes codifican secuencias idénticas en la proteína madura. Esta secuencia presenta una mayor divergencia en su secuencia aminoacídica de la proteína madura respecto de los 4 parálogos, lo que sugiere que *PITG_18670* y *PITG_18675* podrían cumplir funciones distintas en la infección. No se ha determinado en esta tesis u otros trabajos si *PITG_18675* o *PITG_18670* podrían ser reconocidos por *Rpi-blb2*. Esto quedaría por determinar, ya que si bien su secuencia proteica es muy distinta, el aminoácido en la posición 69 que presentan es una valina, no una fenilalanina. Habría que determinar en este punto si la estructura divergente en general es suficiente para quebrar la resistencia aunque esté el aminoácido clave conservado.

Sin embargo, la dupla *AVRblb2/Rpi-blb2* no es el único factor que determina la eficacia de la resistencia al tizón tardío mediada por *Rpi-blb2*. La inmunidad mediada por *Rpi-blb2* requiere la presencia de *NRC4*, un hNLR (ver Introducción). En *N. benthamiana*, el silenciamiento de *NRC4* comprometió tanto la resistencia conferida por *Rpi-blb2* a *P. infestans* como la muerte celular hipersensible inducida por el efector *AVRblb2* (Wu *et al.*, 2017). PiNSL-19 expresa durante la interacción con papa Spunta al efector *PITG_15278*, identificado como modulador de la respuesta inmune mediada por *Rpi-blb2* y *NRC4* (Derevnina *et al.*, 2021). Se ha reportado que *PITG_15278* interfiere con la señalización mediada por *NRC4*, pudiendo contribuir a la evasión de la respuesta inmune desencadenada en el hospedador (Derevnina *et al.*, 2021; Sun *et al.*; 2024). Recientemente, Sun y col. (2024) establecieron mediante ensayos de LC-MS y colP que *PITG_15278* interactúa con EDK1, un LRR-RLK (*Leucin Rich Repeat Receptor Like Kinase*) que al promover la acumulación de la proteína *NRC4* regula positivamente la resistencia a *P. infestans* en *N. benthamiana*. No obstante, pudimos observar un fenotipo resistente en las plantas transgénicas que expresan *Rpi-blb2* en los ensayos de desafío con los aislamientos argentinos de *P. infestans*. Nos queda por determinar si *PITG_15278* está expresado *in planta* durante la interacción con esta línea transgénica de *N. benthamiana*, ya que nuestros datos transcriptómicos provienen de la interacción con papa

Spunta y el control de la respuesta podría estar determinado por un polimorfismo en la expresión del efector dependiente del hospedador. Por otro lado, está reportado que *Rpi-blb2* confiere resistencia al tizón tardío en plantas transgénicas de papa (Van der Vossen *et al.*, 2003; Van der Vossen *et al.*, 2005; Orbezo *et al.* 2016). Será interesante determinar la presencia de homólogos de *NbEDK1* en Spunta para determinar si la interacción efector-blanco descrita en *N. benthamiana* ocurre también en esta variedad de papa.

Los efectores *AVRamr1* y *AVRamr3*, han sido identificados más recientemente (Lin *et al.*, 2020). En el caso de *AVRamr1*, no pudimos detectar variaciones significativas en los niveles de expresión a 24, 48 o 72 respecto a los observados en micelio en placa (Figura 47), aunque sí observamos su expresión en todas las muestras. *AVRamr3*, por su parte, se encuentra diferencialmente expresado a 24 y 48 horas respecto del control (Figura 47). Sin embargo, detectamos la expresión de ambos efectores tanto en las muestras de control (micelio en placa) así como en las muestras de plantas infectadas con un LFC más alto en las muestras *in planta* respecto del control. Esto puede deberse en parte a la elección del corte en LFC que hicimos LFC >4. *AVR-amr3* tiene un pico de LFC de 3,71 a las 24 horas post infección. Otra razón podría ser la expresión constitutiva de estos efectores o que se induzca la expresión también en las condiciones de crecimiento en placa (agar centeno sacarosa).

Rpi-amr3 reconoce la presencia del efector *AVRamr3* de *P. infestans* y activa la oligomerización en resistosomas de los hNRC NRC2 y NRC4, mientras que *Rpi-amr1* detecta *AVRamr1* e induce exclusivamente la formación del resistosoma NRC2 (Ahn *et al.*, 2023). Se ha reportado que el efector de *P. infestans* *AVRcap1b* interfiere con la respuesta inmune mediada por NRC2, afectando potencialmente la activación iniciada por *Rpi-amr1* en presencia de *AVRamr1* (Witek *et al.*, 2021). Observamos que la expresión de *AVRcap1b* en PiNSL-19 se induce durante la colonización de plantas Spunta (Figura 28). Sin embargo, las plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan *Rpi-amr1* fueron resistentes a los aislamientos argentinos de *P. infestans*. Al igual que en el caso de *PITG_15278* (supresor de NRC4), aún es necesario determinar si PiNSL-19 expresa *AVRcap1b* durante la interacción con *N. benthamiana*, un dato clave para interpretar la resistencia observada en plantas transgénicas que expresan *Rpi-amr3*.

Otros genes *R* de interés para programas de mejoramiento genético de papa mediante ingeniería genética incluyen *Rpi-blb1* (anteriormente conocido como *RB*) y *Rpi-vnt1.1*. Junto con *Rpi-blb2*, estos genes fueron introducidos de manera combinada en las variedades Victoria y Desiree (Ghislain *et al.*, 2019). Las líneas transgénicas Victoria 3R demostraron resistencia al tizón tardío en ensayos de campo realizados durante múltiples campañas (Byarugaba *et al.*, 2021). Es relevante destacar que los aislamientos de *P. infestans* presentes en las regiones africanas donde se llevaron a cabo estos ensayos a campo pertenecen al

GML EU_2_A1. En esta Tesis, comprobamos que PiNSL-19 expresa los efectores correspondientes *AVRvnt1* y *AVRblb1* durante la colonización de la variedad Spunta. A diferencia de *Rpi-blb2*, *Rpi-blb1* y *Rpi-vnt1.1* no dependen de la red NRC para desencadenar una respuesta de defensa (Wu *et al.*, 2017). Además, la ausencia de polimorfismos en los loci de *AVRvnt1* en PiNSL-19 y la ausencia del alelo *ipi04* en *AVRblb1* sugieren que estos genes podrían ser efectivos para el control del tizón tardío en el contexto productivo local.

La incorporación mediante ingeniería genética de una combinación de genes *R* identificados como promisorios en este trabajo de Tesis Doctoral en las variedades de papa susceptibles, especialmente Spunta, contribuirían a un manejo sostenible del tizón tardío a campo. Entre ellos destacamos *Rpi-blb2*, *Rpi-amr1*, *Rpi-amr3*, *Rpi-blb1* y *Rpi-vnt1.1*. La aprobación comercial del evento de papa resistente a PVY TICAR (Bravo Almonacid *et al.*, 2012) en el mercado argentino es un antecedente promisorio para futuros eventos que confieran resistencia a enfermedades, permitiendo reemplazar parcial o totalmente el control químico por el control genético.

La producción de papa en Argentina abastece el mercado local, con un cultivo dominado por pocas variedades susceptibles a *Phytophthora infestans*. La producción de papa semilla se encuentra en manos de un número reducido de productores de semilla certificada, quienes abastecen la demanda del sector. Además, el sistema productivo está altamente mecanizado y depende del uso de fertilizantes y fungicidas ([Instituto de desarrollo rural, 2020](#); [Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023](#)). En regiones con una producción intensiva como esta, se ha observado que las poblaciones de *P. infestans* pueden estructurarse de manera particular. Por ejemplo, Brylińska *et al.* (2016) reportaron en Polonia que la estructura poblacional del patógeno difiere notablemente de la observada en regiones con una producción menos intensiva. En este contexto, el modelo productivo argentino podría estar favoreciendo la estabilidad de la estructura clonal del patógeno, dificultando la entrada de otros linajes a través de la importación del producto. La persistencia de *P. infestans* en rastrojos y en plantas guachas, el uso de pocas fuentes de papa semilla y la adaptación de los linajes autóctonos a pocas variedades que dominan el cultivo pueden contribuir a generar un microclima para el patógeno en la región.

Sin embargo, considerando la amplia diversidad del género *Solanum*, que en Argentina cuenta con 123 especies documentadas (Palchetti *et al.*, 2020), no puede descartarse la influencia de otros hospedadores en la dinámica del patógeno. Algunas especies, como *S. dulcamara*, *S. sisymbriifolium* y *S. nigrum*, han sido identificadas como susceptibles a *P. infestans*, lo que sugiere que podrían actuar como reservorios secundarios bajo ciertas condiciones ecológicas (Abreha *et al.*, 2018). Aunque estas interacciones aún no han sido caracterizadas en profundidad, su estudio podría aportar información relevante para futuras

investigaciones epidemiológicas. En paralelo, otras especies silvestres del género como *S. venturii*, *S. chacoense* y *S. americanum*, portadoras de genes *R* específicos para efectores de *P. infestans*, podrían ejercer presión de selección sobre las poblaciones locales de este patógeno.

Comprender las particularidades de la región y el contexto productivo que influyen en las poblaciones argentinas de *P. infestans*, expandir los estudios genómicos y transcriptómicos a nuevos aislamientos y mantener un monitoreo continuo de las poblaciones locales permitirá orientar estrategias de mejoramiento acordes a la dinámica poblacional de *P. infestans* en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del medio Agar Centeno Sacarosa 2%

Para 1 L de medio: 60 g de granos de centeno, 20 g de sacarosa y 15 g de agar.

Los granos se desinfectan en una solución de cloro 0,25 g/litro. Para desinfectar, sumergir los granos en 500ml de cloro durante 4 minutos y luego lavarlos en agua destilada hasta que ya no se sienta olor a lavandina en los granos. Transferir los granos a una bandeja, dispersarlos y agregar agua hasta cubrir los granos por la mitad. Preservar la bandeja de la luz (con papel aluminio) e incubar 24 horas a 25 grados para permitir la germinación de los granos (chequear aparición de raíces).

Transferir los granos germinados a una licuadora, agregar agua hasta que cubra completamente los granos y moler aproximadamente hasta haber partido los granos en tercios. No moler excesivamente. Transferir esta preparación a un vaso de precipitados, llevar a 600 ml con agua destilada y calentar durante 3 horas a 55°C. Colocar en una botella de litro el agar y la sacarosa. Colar los granos y juntar el líquido en un vaso de precipitados. Agregar agua a los granos hasta llegar a un litro. Llenar la botella con el agar y la sacarosa con este líquido. Autoclavar 20 minutos a 121°C.

Aislamiento de *Phytophthora infestans* de material vegetal infectado

El aislamiento de las muestras de *P. infestans* se realizó entre 2019 y 2021. Para generar los aislamientos, se recolectaron muestras de material vegetal infectado de varias regiones productoras de papa en Argentina. El aislamiento se llevó a cabo cultivando los márgenes de las lesiones de los tubérculos o las hojas en un medio RSA suplementado con rifampicina (20 ug/ml), ampicilina (100 ug/ml), PCNB (70 ug/ml) y Benomyl (20 ug/ml). Estas placas se guardan a 15°C en oscuridad durante 10-15 días y se replica en RSA sin antibióticos.

Mantenimiento de cepas de *P. infestans*

Luego del aislamiento, se utilizaron placas de 15 días de *P. infestans* para guardar los aislamientos en nitrógeno líquido. Se obtienen discos de micelio con medio utilizando sacabocados y se guardaron en tubos crioviales de 2 ml con 1,5 ml de DMSO 5%. Estos tubos se guardaron en freezer -80°C overnight y luego se congelaron en nitrógeno líquido. Para utilizar estos aislamientos, se descongelaron retirándolos del nitrógeno y pasándolos inmediatamente a un baño maría a 60°C durante 90 segundos. Una vez cumplido el plazo, los discos descongelados se colocan en placas de RSA fresco y se guardan en oscuridad 10-15 días.

Inducción de la zoosporogénesis para los ensayos de infección

Se inundaron placas de *P. infestans* en RSA de 14 días con 5 ml de agua estéril y se guardaron durante 90 minutos a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se recupera el agua en tubos eppendorf y se cuenta la liberación de zoosporas en cámara de Neubauer. Se ajusta la concentración de zoosporas para llegar a 50000 zoosporas/ml. Esta suspensión de esporas será utilizada en todos los ensayos de infección, utilizando gotas de 10 ul para inocular el material vegetal según sea el caso.

Extracción de ADN mediante protocolo de CTAB

- Cultivar el aislamiento en RSA durante 14 días a 15°C en oscuridad.
- Colocar 50mg de micelio fresco en un eppendorf y agregar 150ul de buffer de extracción y macerar.
- Vortexear, agregar 150 ul de buffer de lisis y 60 ul de Sarkosyl (5g de N-lauryl sarcosina en 100ml de agua)
- Vortexear e incubar 15 minutos a 65°C.
- Realizar una extracción en cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), centrifugar a 14000rpm durante 15 minutos. Tomar la fase acuosa y repetir la extracción clorofórmica.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, adicionar 0,1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 8) y 2 volúmenes de etanol 100% frío. Precipitar el ADN overnight a -20°C.
- Lavar los pellets con alcohol 70% y dejar secar.
- Resuspender el ADN en 20 ul de agua mQ

Identificación de *P. infestans* mediante secuenciación de regiones ITS

Se amplificaron las secuencias correspondientes a la región ITS1, el gen del ARNr 5.8S, la región ITS2 y una porción del gen del ARNr 28S, todas incluidas entre las secuencias reconocidas por los primers ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'). Estas secuencias están presentes en el genoma mitocondrial de *Phytophthora*. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos; 35 ciclos consistentes en desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, annealing a 58°C por 30 segundos, y extensión a 74 °C por 1 minuto; finalmente un último paso de extensión por 10 minutos a 74 °C. Se determinó la presencia de producto

de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en buffer TAE 1x con agregado de Bromuro de Etidio (0,5 µg/10 ml). Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit comercial Wizard SV Clean-Up System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación por Sanger a la empresa MacroGen. Las secuencias obtenidas se curaron manualmente utilizando el programa Chromas Lite (versión 2.1, Technelysium Pty. Ltd., 2012). Se utilizaron las secuencias obtenidas para cotejar la pertenencia a la especie de *Phytophthora* blasteando las mismas contra la base de datos de NCBI.

Ensayos de infección en planta entera: Experimentos de RNA-Seq y qPCR

Se utilizaron 15 plantas de papa Spunta crecidas en condiciones de invernadero por 4 semanas. Para la inoculación, las plantas se llevaron a cámara de cultivo con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 20°C. Se inoculó el folíolo central y los dos pares de folíolos siguientes, dos inoculaciones por folíolo (a ambos lados de la nervadura central) de las hojas 3 y 4 de cada planta. Las inoculaciones se realizaron con suspensiones de zoosporas obtenidas con la metodología descrita previamente. Se extrajeron discos de 10 mm de las áreas de lesión a las 0, 16, 24, 48 y 72 horas después de la infección de 3 plantas en cada tiempo (3 plantas x 2 hojas x 5 folíolos x 2 sitios de inoculación = 60 discos de hoja por tiempo). Los discos de hoja se guardaron en N₂ líquido inmediatamente hasta su utilización. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayos de infección en hoja desprendida: agresividad por área de lesión

Se utilizaron 3 plantas crecidas en invernadero durante 4 semanas de *S. tuberosum* var Spunta, var Kennebec y var Innovator. Se utilizaron el folíolo central y los dos pares de folíolos siguientes de las hojas 3 y 4 de cada planta. En el caso de los ensayos en *N. benthamiana* se utilizaron plantas de 5 semanas. Las hojas o folíolos se colocaron en placas individuales de agar agua y se inocularon con 10 µl de suspensiones de zoosporas como fue descrito previamente. Después de la inoculación, las placas se llevaron a una cámara de crecimiento con un período de luz/oscuridad de 16/8 y se mantuvieron a 20°C. Después de cinco días, se tomaron imágenes de las hojas infectadas y se analizaron a través del paquete de R pliman (Olivoto et al., 2022) para contabilizar el % de área lesionada de cada hoja. Para analizar la posibilidad de que existan diferencias entre estas líneas y aislamientos, construimos un modelo lineal generalizado utilizando la función glm de R. Luego de construir el modelo utilizando como variable respuesta el % de hoja infectada y tomando como variables aleatorias el aislamiento, la línea de *N. benthamiana* y bloqueando por experimentos los

aislamientos, realizamos comparaciones pareadas de los aislamientos mediante el test HSD (*Honestly Significant Difference*) de Tukey.

Ensayos de infección en discos de hoja: agresividad por producción de esporangios

Se utilizaron plantas crecidas en invernadero durante 4 semanas de *S. tuberosum* var Spunta y var Innovator. De las hojas 3 y 4, se tomaron discos de 10 mm de diámetro. Los discos de hoja se dispusieron como en la figura 42 en placas de 24 wells con 1 ml de agar agua. Se utilizaron los aislamientos PiNSL-19 y Ar20079 para inocular una gota de 10 μ l de suspensiones de zoosporas por disco. Las placas con los discos de hoja infectados se colocaron en cámara de cultivo con fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a 20°C. Transcurridas 48, 60, 72, 84 y 96 horas después de la infección, se retiraron las placas y se colocaron los discos de hoja en tubos eppendorf con 1 ml de buffer PBS con 1% de formaldehído. Los tubos se vortexearon y se determinó la concentración de esporangios por disco por ml de buffer por conteo en cámara de Neubauer. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de R glmm y los gráficos se realizaron con ggplot2.

Extracciones de ARN

El ARN total de los tejidos vegetales infectados se purificó por extracción con TRIzol (Invitrogen Life Technologies).

Se congelaron 200 mg de hojas de papa en N₂ líquido y se molieron en un mortero previamente lavado con una solución de SDS 1 %. Se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,5 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguidos de una centrifugación a 15000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75%, se dejó secar y se resuspendió en 50 μ l de H₂O incubando a 60°C durante 10 minutos.

Amplificación de marcadores SSR

Los aislamientos de *P. infestans* se cultivaron en placas RSA para la recolección de micelio. Luego se utilizó una masa de 200 mg de micelio fresco para la extracción de ADN utilizando el método basado en CTAB descrito previamente. Para identificar los

polimorfismos del aislamiento de *P. infestans* recolectado de un cultivo de papas, se evaluaron los marcadores polimórficos de microsatélites (SSR). El protocolo consistió en una reacción de PCR multiplexada con 12 pares de primers sentido y antisentido (Tabla 7) siguiendo la metodología propuesta por Li et al. (2013).

Primer	Secuencia	Ta	%GC
PiG11_f	TGCTATTTATCAAGCGTGGG	59,8	45
PiG11_r	GTTTCAATCTGCAGCCGTAAGA	59,8	45,45
Pi02/PinfSSR3_f	ACTTGCAGAACTACCGCCC	59,3	57,3
Pi02/PinfSSR3_r	GTTTGACCACTTTCCTCGGTTC	59,3	50
PinfSSR11_f	TTAAGCCACGACATGAGCTG	56,6	50
PinfSSR11_r	GTTTAGACAATTGTTTTGTGGTCGC	60	40
D13_f	TGCCCCCTGCTCACTC	59,8	68,75
D13_r	GCTCGAATTCATTTTACAGACTTG	57	37,5
PinfSSR8_f	AATCTGATCGCAACTGAGGG	56,7	50
PinfSSR8_r	GTTTACAAGATACACACGTCGCTCC	62,1	48
PinfSSR4_f	TCTTGTTTCGAGTATGCGACG	56,8	50
PinfSSR4_r	GTTTCACTTCGGGAGAAAGGCTTC	63,4	50
Pi04_f	AGCGGCTTACCGATGG	56,7	62,5
Pi04_r	GTTTCAGCGGCTGTTTCGAC	59,3	55
Pi70_f	ATGAAAATACGTCAATGCTCG	55,6	38,1
Pi70_r	CGTTGGATATTTCTATTTCTTCG	54,4	38,78
PinfSSR6_f	GTTTTGGTGGGGCTGAAGTTTT	62,1	45,45
PinfSSR6_r	TCGCCACAAGATTTATTCCG	58,2	45
Pi63_f	ATGACGAAGATGAAAGTGAGG	57,8	42,86
Pi63_r	CGTATTTTCCTGTTTATCTAACACC	58,4	36
PinfSSR2_f	CGACTTCTACATCAACCGGC	60,4	55
PinfSSR2_r	GTTTGCTTGGACTGCGTCTTTAGC	64,8	50
Pi4B_f	AAAATAAAGCCTTTGGTTCA	53,8	30
Pi4B_r	GCAAGCGAGTTTGTAGATT	58,4	45

Tabla 7: Listado de primers utilizados para el análisis de marcadores microsatélites.

La reacción de PCR se realizó en un Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem, N.Y., U.S.A) e incluyó un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 33 ciclos de amplificación, que incluyeron la desnaturalización del ADN a 95°C (30 segundos), un paso de hibridación de los cebadores flanqueantes a sus secuencias complementarias

(hibridación) a 58°C (90 segundos) y una elongación de los fragmentos a 72°C (30 segundos). Una elongación final a 72°C durante 30 minutos permite reducir la cantidad y el número de amplificaciones espureas debido al desplazamiento de la DNA polimerasa en las regiones repetitivas. Los aislamientos amplificados se sometieron a electroforesis capilar en un secuenciador automático GA 3500XL (Applied Biosystem, N.Y. U.S.A) con un estándar de tamaño de fragmentos GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystem, N.Y. U.S.A). Esta metodología se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de CICVyA, INTA Castelar, de acuerdo con los protocolos operativos estandarizados bajo el sistema de gestión de calidad ISO 17025 y las especificaciones del fabricante. El producto de la corrida electroforética, un archivo con la extensión “.fsa” se obtuvo para cada muestra (aislamiento). Fue analizado por un programa específico (GeneMapper v4.1, Applied Biosystem, N.Y., U.S.A) para la asignación de alelos que estaba adjunto al secuenciador, y se exportó a una hoja de cálculo de MS Excel siguiendo el consenso de asignación de picos de la red Euroblight (Li et al., 2013).

Secuenciación de panel de amplicones y análisis poblacional

El ADN de los aislamientos argentinos se extrajo mediante el método de CTAB descrito anteriormente. Se enviaron 500 ng de ADN de los 20 aislamientos a la empresa MonsterPlex, en California, para la amplificación y secuenciación por Illumina Hi-seq 2000 de los amplicones (ver tabla suplementaria 2). Se evaluó la calidad de los reads mediante el uso de Fastqc y se utilizó flexbar para remover adaptadores. Para hacer el alineamiento de estas muestras, se generó un set de secuencias que se denominó “genoma reducido de referencia” a partir del genoma de la cepa T30-4. El set de amplicones se diseñó de modo tal que los primers de cada secuencia hibridaran alrededor de 80pb río arriba y río debajo de un snp de interés. El enfoque para la construcción del genoma reducido fue entonces tomar 200 pb río arriba y río abajo de esos snps y generar un set de 98 secuencias de 400 pares de bases contra las que alinear los reads. Una vez obtenido el alineamiento, como base para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), un proceso ejecutado utilizando samtools y bcftools. Los SNPs se sometieron a condiciones de filtrado estrictas: i) necesitaban exhibir variación bialélica en comparación con la referencia T30-4 y PiNSL, ii) en la ubicación del SNP, tanto la puntuación de calidad phred de la secuenciación de la base como la puntuación de mapeo de la lectura debían superar 20, iii) cada alelo en un sitio SNP tenía que ser respaldado por un mínimo de cinco lecturas, iv) en los sitios SNP heterocigota, la frecuencia del alelo alternativo estaba restringida al rango de 0.2 a 0.8, v) los llamados de SNP se afinaron utilizando parámetros bioinformáticos para lograr una precisión del 99.0% y una sensibilidad del 85.0%, validada a través del análisis de la tasa de falsos descubrimientos

(*False Discovery rates*) siguiendo un método establecido previamente. A continuación se describe la *pipeline* para generar el vcf multi muestra a partir de los archivos fastq trimmeados, llevarlo a R para generar matrices de distancia, armar un árbol de Neighbour Joining con las relaciones entre las muestras y exportarlo en formato Newick para su visualización con iTol (Letunic & Bork, 2024).

```
# Esta lista de comandos asume que el usuario se encuentra en un directorio que
# incluye todos los archivos fq a utilizar y el archivo fasta a ser utilizado de referencia

#Crear un índice de la referencia
bwa index pi_reduced.fasta

#Alinear al genoma de referencia
for file in *.fq.gz; do
  bwa mem pi_reduced.fasta $file > ${file/%fq.gz/sam}
done

#Sort de los alineamientos
for file in *.sam; do
  samtools sort -o ${file/%sam/sorted.sam} $file
done

#Convertir de sam a bam
for file in *sorted.sam; do
  samtools view -bt pi_reduced.fasta.fai -o ${file/%sorted.sam/bam} $file
done

# crear índices de los alineamientos
for file in *.bam; do
  samtools index $file
done

# quitar los archivos intermedios sam (son pesados)
rm "*.sam"

#Hacer una lista de los archivos bam en el directorio
ls | grep ".bam" > listabam

# Llamado de variantes y profundidad de secuenciación.
#Este paso combina todos los outputs en un solo archivo vcf

bcftools mpileup -Ou -f pi_reduced.fasta -b listabam | bcftools call -mv -o multimuestras.vcf

#Filtrar los SNPs generando un tag "PASS" cuando cada posición cumpla con los criterios de calidad
y profundidad para cada muestra
bcftools filter -Ov -o paper_filtered.vcf -s LOWQUAL -e 'QUAL<20 || DP <20' --SnpGap 5 --set-GTs .
paper.vcf

#Remover aquellas posiciones que no hayan pasado el filtro anterior
bcftools view -f PASS paper_filtered.vcf > paper_filtered_final.vcf

##### En R #####

#Cargar las librerías
library(vcfR)
```

```

library(poppr)
library(ape)
library(adegenet)

# Cargar el vcf
setwd("C:/Users/Marce/Desktop/trabajofinal")
totpop.VCF <- read.vcfR("los100000.vcf")

#Convertir el vcf en un objeto genlight
gl.totpop <- vcfR2genlight(totpop.VCF)

#Seteo de ploidía. Las variantes triploides van a ser un problema.
# Sigo adelante con el análisis, ya que son pocas las variantes con tres valores
#Esto permite omitir del análisis en amplicon seq. En concreto, para el análisis
# presentado en este trabajo, solo 3 variantes son excluidas del análisis
ploidy(gl.totpop) <- 2

#Asignar genotipos reportados a todas las muestras
#Asegurarse que el orden de las muestras y los genotipos esté ok

pop(gl.totpop) <- as.factor(c("01_29.bam", "04NDL217.bam", "06_3920A.bam", "06_3936C2.bam",
"06_3964A.bam", "06_4132B.bam", "06_4168B.bam", "06_4168C.bam", "06_4244E.bam",
"06_4388D.bam", "08_6942A.bam", "08_6946A.bam", "08_6946B.bam", "08_7054A.bam",
"08_7054C.bam", "14D11A.bam", "14D11B.bam", "14LD1B.bam", "14T3A.bam",
"95_17_3_2.bam", "95_197.bam", "96_145_1.bam", "96_145_7.bam", "97_253_05.bam",
"97_28_1_1.bam", "97_310_07.bam", "97_345_05.bam", "97_346_02.bam", "97_36_2_2.bam",
"97_40_1_3.bam", "98_142_06.bam", "98_142_08.bam", "Ar20079.bam", "Ar20080.bam",
"Ar20094.bam", "Ar20100.bam", "Ar20101.bam", "Ar20102.bam", "Ar20105.bam",
"Ar20110.bam", "Ar20111.bam", "Ar20112.bam", "Ar20114.bam", "Ar21001.bam",
"Ar21002.bam", "Ar21009.bam", "Ar21015.bam", "Biocca.bam", "CA65.bam",
"Cba2.bam", "FAB22002G.bam", "FAB22005E.bam", "FAB22012E.bam", "Garcia.bam",
"PiNSL.bam", "Tafi.bam"))

#Excluyo muestras en el dataset que no me interesa incluir en el análisis
samples_to_remove <- c("97_28_1_1.bam", "06_3936C2.bam", "06_4388D.bam", "97_40_1_3.bam",
"98_142_06.bam", "06_4244E.bam", "01_29.bam", "06_3920A.bam",
"CA65.bam", "14D11A.bam", "14D11B.bam", "FAB22002G.bam", "FAB22005E.bam", "FAB22012E.bam",
"97_130_07.bam", "08_7054A.bam", "95_17_3_2.bam")
gl.totpop_filtered <- subset(gl.totpop, !(indNames(gl.totpop) %in% samples_to_remove))

#Crear un árbol Neighbor Joining con distancias de nei y 100 réplicas, guardarlo en un
#archivo en formato Newick.
tree <- aboot(gl.totpop, tree = "nj", distance = nei.dist,
sample = 100, showtree = T, cutoff = 50, quiet = T)

write.tree(tree, file = "100k_arbol_poppr.newick")

```

Secuenciación del genoma completo y análisis genómico del aislamiento PiNSL-19

El genoma completo del aislamiento PiNSL-19 fue secuenciado utilizando una plataforma Illumina Hi-seq 2000, obteniendo un conjunto de datos de 59,354,496 lecturas apareadas con una longitud de 150 pares de bases. Los datos de secuencia resultantes se han archivado en el Sequence Read Archive (SRA) bajo el número de acceso [numero]. Después de la evaluación de calidad a través de fastqc y flexbar (Roehr et al., 2017), las lecturas limpias se alinearon al genoma de referencia T30-4 utilizando un software de

transformación de Burrows Wheeler (BWA) versión 0.7.17 (Li & Durbin, 2009). Este alineamiento sirvió como base para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), un proceso ejecutado utilizando samtools y bcftools. Los SNPs se sometieron a condiciones de filtrado estrictas: i) necesitaban exhibir variación bialélica en comparación con la referencia T30-4 y PiNSL, ii) en la ubicación del SNP, tanto la puntuación de calidad phred de la secuenciación de la base como la puntuación de mapeo de la lectura debían superar 20, iii) cada alelo en un sitio SNP tenía que ser respaldado por un mínimo de cinco lecturas, iv) en los sitios SNP heterocigota, la frecuencia del alelo alternativo estaba restringida al rango de 0.2 a 0.8, v) los llamados de SNP se afinaron utilizando parámetros bioinformáticos para lograr una precisión del 99.0% y una sensibilidad del 85.0%, validada a través del análisis de la tasa de falsos descubrimientos (*False Discovery rates*) siguiendo un método establecido previamente. Se cuantificaron la cobertura de lectura promedio, los números de copia de genes y la profundidad de lectura específica del gen.

Análisis de genómica comparativa

Los análisis de asignación de CNV se realizaron incluyendo los datos de PiNSL-19 en la pipeline publicada por el laboratorio de Niklaus Grunwald. El mismo se puede ver en https://github.com/grunwaldlab/P_infestans_CNV.

Por otro lado, para el uso de diagramas de Venn, conteo de SNPs por muestra, y modelado de árboles por Neighbor Joining y Maximum Likelihood, se crearon una lista de jupyter notebooks que incluyen todo lo requerido para, a partir de un VCF multisample, generar todos los análisis relacionados con estos gráficos. Estas notebooks pueden obtenerse en mi GitHub personal:

<https://github.com/marcejuarez90/VCFtoMSA/tree/main>

Secuenciación de ARN y análisis

La extracción de ARN total se realizó en micelio y hojas de papa infectadas recolectadas a los 0, 16, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación utilizando el reactivo TriZol y siguiendo el protocolo del fabricante. La secuenciación de ARN fue subcontratada a Novogene, utilizando bibliotecas *paired end* (PE) de 150 pb de Illumina HiSeq2000. Las lecturas se comprobaron inicialmente en cuanto a calidad utilizando fastQC, seguido del recorte de secuencias de los adaptadores de Illumina y bases de baja calidad con flexbar. La alineación de las lecturas recortadas al genoma de referencia de *P. infestans* T30-4 se ejecutó utilizando HiSat2, y la asignación a nivel de genes se realizó utilizando HTSeq. Los análisis estadísticos posteriores se realizaron en R. El análisis de expresión diferencial se ejecutó

utilizando el paquete DESeq2. Además, se emplearon varios paquetes de R, incluyendo ggplot2, dplyr, BiocParallel y ComplexHeatmap para los análisis posteriores. Los genes que mostraban una expresión diferencial durante la infección se identificaron en base a los criterios de un valor $p < 0.05$ y un cambio de expresión > 16 (LFC > 4).

```
##### En bash #####
```

```
#Extraer del genoma de referencia (gtf) sitios de splicing y exones para indexar el genoma contra el que alinear las muestras
```

```
hisat2_extract_splice_sites.py /ruta/al/gtf/transcripts.gtf > /ruta/a/el/output/splicesites.tsv
```

```
hisat2_extract_exons.py /ruta/al/gtf/transcripts.gtf > /ruta/a/el/output/exons.tsv
```

```
hisat2-build -p 8 --ss /ruta/splicesites.tsv --exon /ruta/exons.tsv
```

```
/ruta/al/fasta/referencia/phytophthora_infestans_t30-4.fasta /ruta/almacenamiento/indexado
```

```
#Hacer el alineamiento del fq de cada muestro contra el genoma indexado
```

```
hisat2 -p 8 --rg-id=A1 --rg SM:A1 --rg PL:ILLUMINA -x /ruta/a/indexado/del/genoma --dta --rna-strandness RF -1 /ruta/a/fq/fw/A1_1.fastq -2 /ruta/a/fq/rv/A1_2.fastq -S /ruta/sam/output/A1.sam
```

```
#Sam a bam
```

```
samtools sort -@ 8 -o A1.bam A1.sam
```

```
#htseq: contar reads que pegan contra cada gen
```

```
htseq-count --format bam --order pos --nonunique all --mode intersection-strict --stranded reverse --minqual 1 --type exon --idattr gene_id /ruta/al/alineamiento/A1.bam /ruta/al/gtf/transcripts.gtf > /ruta/guardar/conteo/de/reads/A1.tsv
```

```
# Unir las tablas de cada muestra en una sola tabla y agregar headers
```

```
join A1.tsv A4.tsv | join - B1.tsv | join - B2.tsv | join - B3.tsv | join - B4.tsv | join - B5.tsv | join - C1.tsv | join - C2.tsv | join - C3.tsv | join - C4.tsv | join - C5.tsv | join - Ctrl1.tsv | join - Ctrl2.tsv > all_gene_counts.tsv
```

```
echo "GeneID A1 A4 B1 B2 B3 B4 B5 C1 C2 C3 C4 C5 Ctrl1 Ctrl2 " > header.txt
```

```
cat header.txt all_gene_counts.tsv | grep -v "___" | perl -ne 'chomp $_; $_ =~ s/\s+/\t/g; print "$_\n" > pinsl.tsv
```

```
##### En R #####
```

```
library(DESeq2)
```

```
#Definir carpeta de trabajo
```

```
setwd("G:/Mi unidad/scripts/")
```

```
#Leer tabla de datos, ordenarla para que las muestras control queden primeras y leer tabla de diseño experimental
```

```
all_gene_counts_final <- read.delim("pinsl.tsv", row.names=1)
```

```
cts <- all_gene_counts_final[, c(13,14,1:12)]
```

```
COLDATA2...Hoja.1$tiempo <- as.factor(COLDATA2...Hoja.1$tiempo)
```

```
COLDATA2...Hoja.1$batch <- as.factor(COLDATA2...Hoja.1$batch)
```

```

#Crear objeto DESeq, hacer análisis y guardar los resultados
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = cts,
                              colData = COLDATA2...Hoja.1,
                              design = ~ tiempo)

dds

dds <- DESeq(dds)
res <- results(dds)

# Crear LFCs para cada tiempo

resLFC_T1 <- lfcShrink(dds, coef=2, type="apeglm")
resLFC_T2 <- lfcShrink(dds, coef=3, type="apeglm")
resLFC_T3 <- lfcShrink(dds, coef=4, type="apeglm")
resLFC_T4 <- lfcShrink(dds, coef=5, type="apeglm")
resLFC_T5 <- lfcShrink(dds, coef=6, type="apeglm")

# Extraer de las tablas anteriores una nueva tabla que contenga todos los tiempos en función de
#su p-valor y log fold change
tabla_LFC_pvalor <- data.frame(T1LFC=resLFC_T1$log2FoldChange,
                               T1pval=resLFC_T1$padj,
                               T2LFC=resLFC_T2$log2FoldChange,
                               T2pval=resLFC_T2$padj,
                               T3LFC=resLFC_T3$log2FoldChange,
                               T3pval=resLFC_T3$padj,
                               T4LFC=resLFC_T4$log2FoldChange,
                               T4pval=resLFC_T4$padj,
                               T5LFC=resLFC_T5$log2FoldChange,
                               T5pval=resLFC_T5$padj)

write.table(x = tabla_LFC_pvalor,file = "tabla_LFC_pvalor.tsv",sep = "\t",row.names = TRUE)

#Utilizar esta tabla para los análisis (heatmaps, volcano plots, expresión de genes particulares)

```

Validación de la expresión génica con qPCR

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para validar los resultados de expresión génica obtenidos de la secuenciación de ARN. Se seleccionó un subconjunto de cinco genes objetivo para la validación (*PITG_14371*, *PITG_08943*, *PITG_21388*, *PITG_04339* y *PITG_09173*), sirviendo el gen del factor de elongación (*PITG_10941*) como gen de referencia para fines de normalización. El diseño experimental fue igual al de la RNAseq. La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el método TRIzol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA, se empleó el kit PROMEGA. Las reacciones de qPCR se realizaron empleando la enzima FIREpol, utilizando cebadores específicos para cada gen listados en la Tabla 8. Se obtuvieron valores CT para ambos genes objetivo y EF2a. Posteriormente, se empleó el método delta delta CT para determinar los niveles de expresión génica relativa entre las muestras de control y experimentales en cada punto de tiempo respectivo. Los datos de qPCR resultantes se compararon entonces con los perfiles de expresión génica derivados del análisis de RNA-seq para determinar la consistencia y precisión de este último.

Primer	Secuencia	Ta	%GC
qRT_04339_F	AGGGCGTGTACTGGGAATAC	61,1	55
qRT_04339_R	CGGGCAGGGGTTTATTTGAC	61,3	55
qRT_08943_F	ACCCTGAAGAAGCTCAATCC	60,5	50
qRT_08943_R	CTTTTCCGTGACCTCTTTAGC	59,9	47,6
qRT_14371_F	CGCCATAAACTTTGCAACCA	60	45
qRT_14371_R	TGCCGGCTGAATCGTGTAT	60,3	52,6
qRT_10941_F1	CACGCTGATGCTATTCACC	59,4	52,6
qRT_10941_R1	TGACAAGCGTACACCACAC	59,4	52,6
qRT_10941_F2	CTTACCTGCCTGTCAACGAG	59,7	55
qRT_10941_R2	AACCTGGTAGTGGTCTGAAC	59,9	52,6
qRT_PITG_09173_1F	AGTTCCACGTTTCCGGTTGC	60	55
qRT_PITG_09173_1R	TTGGTCCACGACTGCGAGTAG	60,7	57,14
qRT_21388_F1	ATCCAAGATTCGCTTTCTGTCC	61,8	45,45
qRT_21388_R1	CTTCGTATCGCAACACCGTC	61,3	55

Tabla 8: Listado de primers utilizados para los ensayos de expresión diferencial de genes mediante RT-qPCR.

ANEXO

Tabla Suplementaria 1: Familia de genes *AVRblb2*.

Gene_ID	Intergenic	Supercont	Parálogo	Plantas R2
<i>PITG_04081</i>	GSR	supercont1.5		s/d
<i>PITG_04085</i>	InBtw	supercont1.5	Si	Resistente
<i>PITG_04086</i>	InBtw	supercont1.5	Si	Resistente
<i>PITG_04089</i>	GSR	supercont1.5	Si	Resistente
<i>PITG_04090</i>	GSR	supercont1.5	Si	Resistente
<i>PITG_04097</i>	GSR	supercont1.5		s/d
<i>PITG_04194</i>	GSR	supercont1.5		s/d
<i>PITG_09632</i>	GSR	supercont1.15		s/d
<i>PITG_18670</i>	InBtw	supercont1.79		s/d
<i>PITG_18675</i>	GSR	supercont1.79		s/d
<i>PITG_18683</i>	GSR	supercont1.79		s/d
<i>PITG_18685</i>	Not	supercont1.79		s/d
<i>PITG_20300</i>	GSR	supercont1.125	Si	Resistente
<i>PITG_20301</i>	GSR	supercont1.125	Si	Susceptible
<i>PITG_20303</i>	Not	supercont1.125	Si	Suceptible
<i>PITG_20857</i>	GSR	supercont1.216		s/d
<i>PITG_22604</i>	Not	supercont1.4287		s/d
<i>PITG_22727</i>	GSR	supercont1.5		s/d
<i>PITG_23193</i>	InBtw	supercont1.216		s/d

Familia de genes *AVRblb2*. Se detalla código del gen en la referencia (T30-4), ubicación en el genoma, contig, si pertenece al conjunto de parálogos *AVRblb2* y si está descrita su interacción con R2.

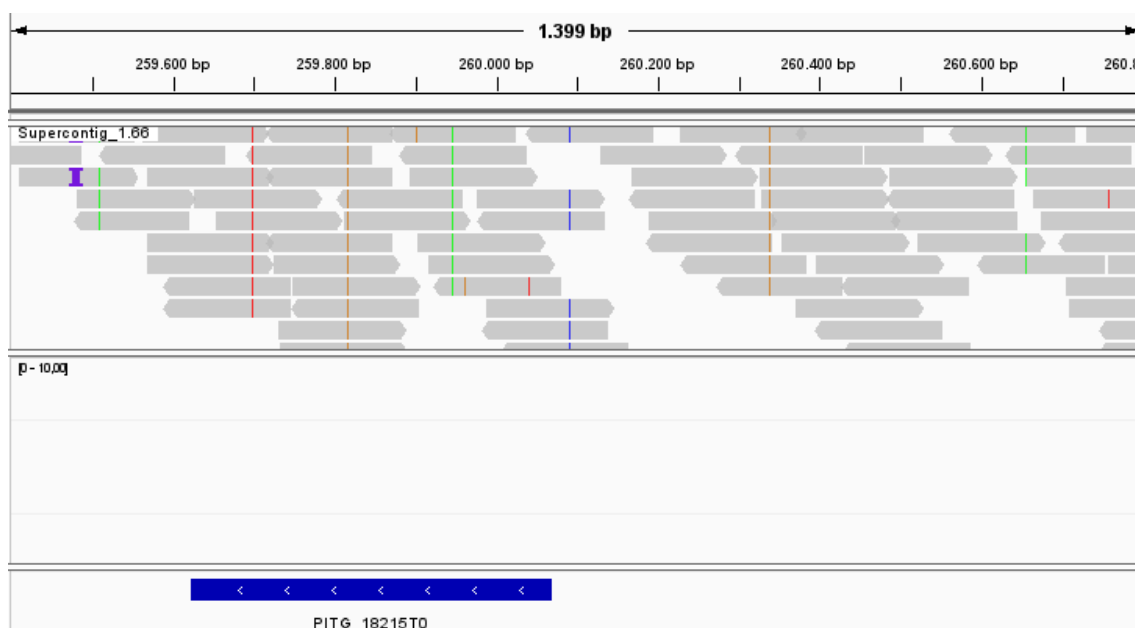


Figura Suplementaria 1. Análisis genómico y transcriptómico del locus *AVR3b* en PiNSL-19. La sección superior muestra los datos genómicos, donde se observa la presencia del locus *PITG_18215T0* con tres mutaciones en homocigosis dentro del gen y otras tres río arriba del codón de inicio. La sección inferior corresponde a los datos transcriptómicos, donde no se detectan lecturas alineadas del patógeno en ninguno de los tiempos analizados (se muestra el tiempo de 48 horas post infección). Estos datos fueron visualizados utilizando el genome browser IGV.

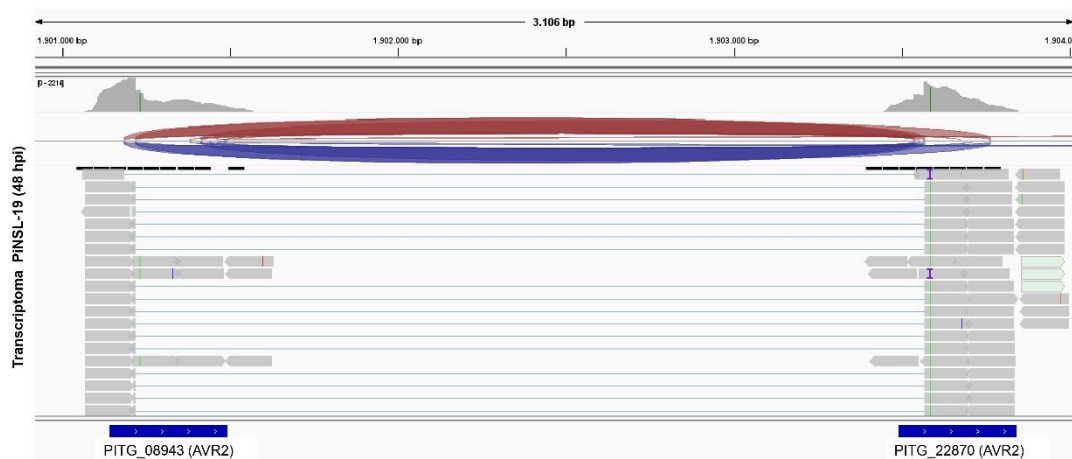


Figura Suplementaria 2: Expresión de los genes *PITG_08943* y *PITG_22870* visualizada mediante genome browser (IGV). En el sashimi plot, puede observarse el fuerte grado de equivalencia de ambos sitios para la asignación de lecturas.

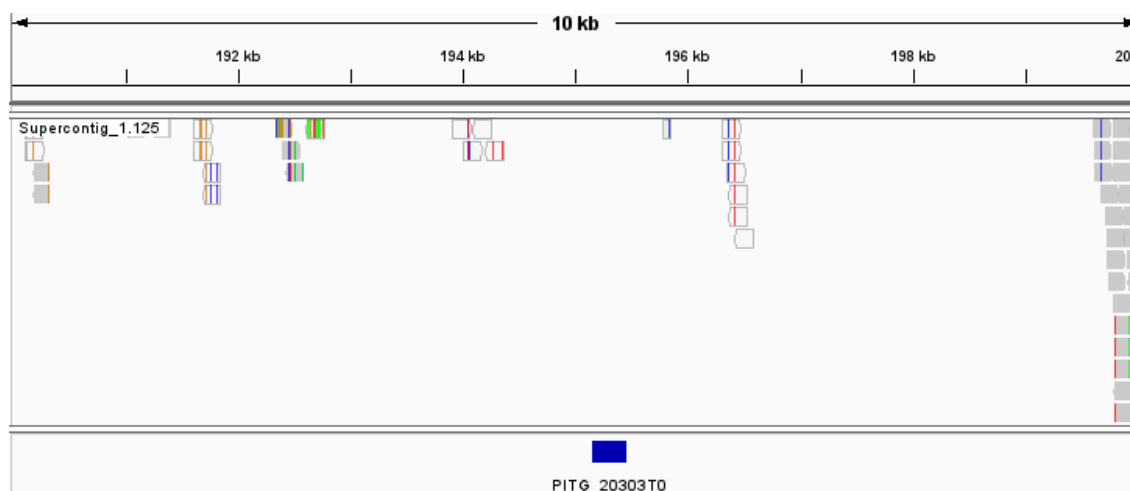


Figura Suplementaria 3: Ausencia del locus *PITG_20303* en PiNSL-19. Representación genómica en un navegador de secuencias donde se observa la falta de lecturas alineadas en la región correspondiente al locus *PITG_20303* (indicada en azul).

Tabla Suplementaria 2: Panel de Secuenciación de Amplicones.

Seq ID	Orientación	Largo	tm	GC%	Seq
1.1_2422620	FORWARD	20	59.47	60.00	CGCTTGAGCTAGAGGAGGAG
1.1_2422620	REVERSE	18	60.73	66.67	CTCTGACGCGCCGTCTAC
1.1_3023095	FORWARD	20	59.99	55.00	GGTGAAGAAGAAGCCGAGTG
1.1_3023095	REVERSE	20	59.61	50.00	CCGACAACAACCGACTACA
1.1_3547675	FORWARD	19	60.33	57.89	AGCTAGCTGCGTGATGTCG
1.1_3547675	REVERSE	21	60.67	47.62	TGTGTAGCCTGAAAACCAGGA
1.1_5516055	FORWARD	20	59.45	55.00	CTTGACTCCTTCGTCGAGT
1.1_5516055	REVERSE	20	59.17	55.00	CCTGTACGACATGTTGCTC
1.1_931590	FORWARD	20	59.86	45.00	GCGCGTGGGTTTATTTATGT
1.1_931590	REVERSE	20	59.81	50.00	GGATCGAAGCCTTCACAAAG
1.10_120399	FORWARD	20	61.49	55.00	CCACCCTGAACGATCATCTG
1.10_120399	REVERSE	20	60.80	50.00	TTGATCGACTGCAGGAGGTT
1.10_651437	FORWARD	20	60.25	50.00	ACCTGGGAAAGCGTCTTCT
1.10_651437	REVERSE	20	59.77	50.00	AGCGTGAGTTTGGTTCAGGT
1.101_224249	FORWARD	20	60.13	55.00	CAAACGAGGAGGAGAAGCTG
1.101_224249	REVERSE	20	59.01	55.00	GTACGGAGTCAACACCATCG
1.11_1535743	FORWARD	20	59.96	50.00	AAAGTACGGGGATGATGCAG
1.11_1535743	REVERSE	20	60.73	50.00	TAGCCATTCTGGAGGCGTA
1.11_1730516	FORWARD	20	59.84	45.00	TGACAAATGCCAAGTTTCTCG
1.11_1730516	REVERSE	21	59.85	47.62	TCGTGAGCAATCGTAGATCCT
1.11_1786659	FORWARD	20	59.58	50.00	ATTGGACGTGGTCAAGACT

1.11_1786659	REVERSE	20	59.53	55.00	GGGTCTCCTTCAAGCTCTCA
1.11_2708319	FORWARD	20	59.79	50.00	GCTGACATCGTCTCCATCAA
1.11_2708319	REVERSE	19	60.10	42.11	AATTTGCGCACGATCACAT
1.11_3350688	FORWARD	20	60.13	50.00	AGCGTATTCGCTCTGTTGG
1.11_3350688	REVERSE	21	60.31	57.14	TGTGGACGTCTCTAGGACAGG
1.11_360197	FORWARD	20	60.12	50.00	GAGGGCGAAACACTGACATT
1.11_360197	REVERSE	20	59.90	50.00	GCTGTTCTTGCCTTTCTCT
1.110_128637	FORWARD	20	59.47	40.00	TTCATTCGATGAATCGTTGG
1.110_128637	REVERSE	22	60.36	54.55	AGCTGAACTAGCCTACGAGCTG
1.12_1773750	FORWARD	20	60.53	55.00	TAAAGTGGAGCCGTCTCTCG
1.12_1773750	REVERSE	20	59.14	50.00	GCCTCTTGGTGCCTTCATT
1.13_2911071	FORWARD	20	60.35	60.00	CGCTACGTACACCGCCTAGT
1.13_2911071	REVERSE	20	59.86	60.00	CAGGCCTGTACCTCCTTCTG
1.131_108866	FORWARD	20	60.00	55.00	CCCACAGACCTGGTGAGTTT
1.131_108866	REVERSE	20	60.07	50.00	CTGGATGCCAACCTGAAGAT
1.132_128908	FORWARD	21	59.33	47.62	TCCTGATCTTTACTCCGTTGC
1.132_128908	REVERSE	20	60.05	55.00	GGGTCAGTGAGAGGGATCAA
1.14_1462417	FORWARD	20	60.33	50.00	TCCCGAAGACTCATTCTCG
1.14_1462417	REVERSE	20	59.84	55.00	GCAACAAGAAGGAGGGTGAG
1.14_1932533	FORWARD	20	60.56	50.00	TGATGAGGACACGAAGCTCA
1.14_1932533	REVERSE	20	59.59	55.00	CCTCTAACACCCCAAAAGC
1.14_2071843	FORWARD	21	59.89	52.38	GCGACTGTGTCGAATCTTAGG
1.14_2071843	REVERSE	22	58.79	45.45	CTCAAATCGAGACTCAATGACC
1.15_2282336	FORWARD	20	60.09	45.00	TCAAAGTGGACGTGGATGAA
1.15_2282336	REVERSE	20	59.71	50.00	GCTACGGAAGAATTGGAACG
1.15_2332768	FORWARD	20	61.10	55.00	CAAAGCCTGCGTGTAGAGC
1.15_2332768	REVERSE	20	59.08	50.00	GTCGACGACTTCAACGCTAA
1.16_588934	FORWARD	20	60.68	50.00	CAAGCAGAAATCGACGCTCT
1.16_588934	REVERSE	20	60.80	55.00	GTACGTTCCGCGAGATTCTG
1.17_1706137	FORWARD	20	60.00	55.00	CCGGTATCGAGCTTAGCAG
1.17_1706137	REVERSE	20	58.93	55.00	CAGGAGGGGAAACAGCTTAG
1.17_1717761	FORWARD	20	59.51	55.00	CGGGATCCACTTCTATCGTC
1.17_1717761	REVERSE	20	59.88	50.00	CATGTTAACGGTGGTGAACG
1.17_887082	FORWARD	20	59.98	50.00	TCTCCAGTCGCTTCATGTTG
1.17_887082	REVERSE	22	59.91	45.45	TGCTTCCAGAACTACCTGAACA
1.18_1156420	FORWARD	20	59.18	50.00	GCTTGGCATCTGCTGTAGAA
1.18_1156420	REVERSE	19	61.09	63.16	CGGAGGCTAAGACGACAGC
1.18_835118	FORWARD	20	60.72	50.00	CGTTGTATTGTGCTCCGTC
1.18_835118	REVERSE	20	59.99	50.00	GCCAGGAACTTTGCTCAAG
1.19_1085064	FORWARD	20	59.44	50.00	TAGCGACTTGGTCTCCACAA
1.19_1085064	REVERSE	18	60.38	61.11	CTGTTGCTCGCCGTATCC

1.19_1425123	FORWARD	20	61.39	55.00	TCCAGGTCACCTCGAGAACG
1.19_1425123	REVERSE	19	58.91	47.37	GGTTTTGCAAGAAGGCGTA
1.2_1316873	FORWARD	20	59.63	55.00	GCGTAGTCAGCATTACAGCAC
1.2_1316873	REVERSE	20	59.73	50.00	GCTATTCCGCGAGCTAAAGA
1.2_3934005	FORWARD	20	60.13	45.00	AAAAGAAGCTGTGCCTTCA
1.2_3934005	REVERSE	20	60.46	40.00	TATGCCGCCTGAATTGTTT
1.2_4048575	FORWARD	20	61.26	60.00	CGACAAGTAGGAGCGAGCTG
1.2_4048575	REVERSE	20	60.07	50.00	CAGGATTTCCCACGAAGTA
1.20_436558	FORWARD	20	60.31	55.00	GTCTGAAGAGCGTGGTGGT
1.20_436558	REVERSE	20	59.69	50.00	TGGAATAGCTTCGTGGGACT
1.21_1258416	FORWARD	20	58.32	45.00	CTTTAACAGCTGCCGAAAGA
1.21_1258416	REVERSE	20	59.96	55.00	GAGAAAGCATGAGCCTGTCC
1.21_544320	FORWARD	20	60.83	55.00	CAAGTGAGCAAGTCCCGTTC
1.21_544320	REVERSE	20	60.10	55.00	GGAGAGCAATGAGCCAAGAG
1.25_1192926	FORWARD	18	59.99	50.00	ATGGGCTATCGCCATTGA
1.25_1192926	REVERSE	20	59.65	50.00	AAAGAGATCGGTGGAGGTGA
1.25_1633422	FORWARD	19	60.09	52.63	ATACTGGCTTCGGGCAAAC
1.25_1633422	REVERSE	20	59.88	55.00	CTCAGCTGCATCTTCGTGAG
1.25_876700	FORWARD	21	58.19	47.62	AATAGGCTACCAAGTCTGCT
1.25_876700	REVERSE	20	59.86	50.00	CGGTCAAACCTCGACTGCATA
1.26_210006	FORWARD	20	60.51	55.00	CGTTGACGTTGTAGCTCGTG
1.26_210006	REVERSE	20	60.28	50.00	TAGTGGCTCGTATGCCAACA
1.27_816888	FORWARD	20	60.77	55.00	GTATGCGCCTCGCTTACATC
1.27_816888	REVERSE	20	59.41	55.00	GGATGGACTCCTTGTAACG
1.27_852653	FORWARD	20	60.85	60.00	GAGGTGCTGACCGCTAACAG
1.27_852653	REVERSE	20	60.82	55.00	CCAAGATTCCTCCTCCAAC
1.28_1695210	FORWARD	20	59.75	55.00	GGACTACGACGACACGTTGA
1.28_1695210	REVERSE	20	59.86	55.00	GATGGACACGTAGAGCGTGA
1.29_581789	FORWARD	18	60.03	61.11	GACGATGGCGAGGAGAGA
1.29_581789	REVERSE	20	60.38	45.00	ACAATTGCATCGTCCCACTT
1.29_852731	FORWARD	21	60.11	42.86	AACAGGAGGCATATTCGCTTT
1.29_852731	REVERSE	22	59.70	40.91	TTATTTGCTCTTAGCTGCAACG
1.3_2243661	FORWARD	20	59.71	55.00	GACAGTGTGACGGTCAAGGA
1.3_2243661	REVERSE	20	61.28	60.00	GAGATCTTGGCGTCTCCTC
1.3_3220722	FORWARD	20	60.78	55.00	CGCACCCTAGTATCTTTGG
1.3_3220722	REVERSE	18	60.25	55.56	AGCAAGCTGGCGAATCTG
1.3_4145204	FORWARD	20	59.69	50.00	TGACGCTTCCCTAGTCCAT
1.3_4145204	REVERSE	20	60.02	55.00	GGTGCCGGTAGTTGCTGTAT
1.30_440315	FORWARD	20	60.12	50.00	CCATGCAACTCACGTTTCATC
1.30_440315	REVERSE	20	60.27	55.00	AGCGGTCCGTCTCTTAAC
1.302_59924	FORWARD	20	59.07	55.00	CGAGAAGCCTAAGGACCAAG

1.302_59924	REVERSE	21	60.59	47.62	GGCCAACGTTTTATCGTACC
1.315_63639	FORWARD	20	59.98	45.00	CAGCCTCAATGCAGCAAATA
1.315_63639	REVERSE	20	59.81	55.00	CTCGAAGCTGTTGCGTGTAG
1.32_896666	FORWARD	20	59.07	50.00	TGCGACTAACTCCAAAGTCG
1.32_896666	REVERSE	20	60.20	55.00	TCCATCGAGACCTCAAGTCC
1.33_979119	FORWARD	20	58.98	50.00	TCATTGCTCTCGATCTACCG
1.33_979119	REVERSE	19	59.71	52.63	GAGAGCGACGGAGCTTTTT
1.34_566592	FORWARD	20	59.74	45.00	TTAATGTGGCTGCGTTGAC
1.34_566592	REVERSE	20	60.06	50.00	TCCGCCAGCTTATCATTACC
1.34_566663	FORWARD	20	58.75	45.00	TAATGATAAGCTGGCGGATG
1.34_566663	REVERSE	20	59.68	50.00	TCAGGAACGTGTCAATCTGG
1.34_578357	FORWARD	23	59.88	43.48	GAGAATGAAGAAACGTCTGAGGA
1.34_578357	REVERSE	20	59.74	40.00	CAACGCAGCCACATTAATAA
1.34_951463	FORWARD	20	59.75	55.00	AGGAGCTCAAGACGCTGTTC
1.34_951463	REVERSE	20	61.30	50.00	GCGTCCTCGCACATCTTAAA
1.36_905326	FORWARD	20	60.68	55.00	TCTGGTCGAAGCGACTAAGC
1.36_905326	REVERSE	20	60.42	55.00	CGGTCTACAATGCTCCTGCT
1.4_2458623	FORWARD	23	59.88	34.78	CAGTTATCAAATGGCAATCACAA
1.4_2458623	REVERSE	20	60.04	55.00	AGTCGGTGCCACAACCTTACC
1.4_3096042	FORWARD	20	59.90	50.00	AGTCTTACGCCGCTGTTGAT
1.4_3096042	REVERSE	20	60.01	60.00	GCGTCTCCCTTCTGTCTACG
1.40_751211	FORWARD	20	60.49	55.00	GTACATGGCATCTCCCAAGC
1.40_751211	REVERSE	20	59.84	45.00	TTCGCAAATGGACACTTCAG
1.40_977746	FORWARD	20	60.16	55.00	TAGTGCTGGGAGAGCTTCGT
1.40_977746	REVERSE	20	59.97	40.00	CAATGCGGTTGAAAAATGTG
1.43_780367	FORWARD	20	59.67	50.00	CATCGAGAAGCTGGGTGCATA
1.43_780367	REVERSE	20	59.12	45.00	TTTACACATCCCTGCCTTGA
1.44_558022	FORWARD	20	59.42	50.00	CCACGGATTTCCCTTACAG
1.44_558022	REVERSE	20	60.30	55.00	AACGACTCACGTTCTCCTG
1.5_1367534	FORWARD	20	59.49	50.00	GACCTGGATCATGGCTTTTC
1.5_1367534	REVERSE	20	60.91	55.00	GCCCTTGATCATCTCTGCTG
1.5_1450337	FORWARD	20	60.13	50.00	CGAGGTTTTACCAGCATCGT
1.5_1450337	REVERSE	19	59.42	52.63	GCGGAGGCTTTGATAACT
1.5_3518729	FORWARD	20	60.89	55.00	CGCCCAACCTCTCTTCTT
1.5_3518729	REVERSE	20	59.50	45.00	CCGCTCGCAATCTAAAAAGT
1.50_304997	FORWARD	18	60.68	61.11	CCTCGCTGAGCGTGAATC
1.50_304997	REVERSE	20	60.42	55.00	CACAGGAGCTGGCGATTACT
1.50_432212	FORWARD	19	60.06	52.63	GATCACGATGTCGGTTTCG
1.50_432212	REVERSE	20	59.21	55.00	GCCGAGGTGGTAACTCACT
1.51_910750	FORWARD	21	60.42	47.62	TGTTCTGTGCCCTTCTCCTTG
1.51_910750	REVERSE	20	59.90	55.00	TTGTCGACAGCGTCACTACC

1.53_801138	FORWARD	20	60.26	50.00	ATTTGCTGTGTCGAGTCC
1.53_801138	REVERSE	20	58.69	50.00	ATAGATATGGGGAGGCATGG
1.6_2277226	FORWARD	20	59.70	55.00	TAGGATGGACGTGTCGACTG
1.6_2277226	REVERSE	20	60.28	55.00	ACTCGCTTCGGTCAGGTATG
1.60_313677	FORWARD	19	59.54	52.63	CTTTGGACAGCGCATTCTC
1.60_313677	REVERSE	20	59.95	55.00	GCTCCTGACGAGCGAATATC
1.63_646558	FORWARD	20	60.21	50.00	GACGCGGATACCTTGAGAAA
1.63_646558	REVERSE	19	61.44	57.89	CCCATAACAGCCCCGAACAG
1.64_470447	FORWARD	20	61.10	50.00	ACGATGAAGTGGCCAAACAG
1.64_470447	REVERSE	20	59.75	55.00	AGCTTCACGTCCTGCTTCTC
1.66_466001	FORWARD	20	59.29	50.00	CAGCGTCCTGATGTTGTTTC
1.66_466001	REVERSE	20	60.11	50.00	GGAAGTCCACGGAAGTAA
1.67_337817	FORWARD	20	59.86	55.00	GATACTGTGGTCTGGCTCA
1.67_337817	REVERSE	19	60.06	57.89	CATCCAGGATCGTCGACAC
1.67_362687	FORWARD	18	60.15	61.11	GCACTGCGTGATCGACAG
1.67_362687	REVERSE	20	59.73	55.00	CCCAGCTTTCCTCACGTTAC
1.69_251262	FORWARD	20	60.39	60.00	CAGAGATCCTGAGGGGTGA
1.69_251262	REVERSE	20	59.83	55.00	TATGGGAGACACCTCGCTCT
1.7_3067555	FORWARD	20	59.68	50.00	GCACGAGATGGTCGTAATCA
1.7_3067555	REVERSE	19	60.38	57.89	GCTCCGTCCTACGATTGCT
1.7_3487748	FORWARD	21	59.37	38.10	TTTTCTTTGGCCAACTCTTTG
1.7_3487748	REVERSE	20	59.87	50.00	TGACGACTCGTGCCTTATC
1.7_4041958	FORWARD	19	60.27	47.37	TGTGTTAACGCAGCCGATT
1.7_4041958	REVERSE	20	59.87	50.00	ACAGCTCTCGTTCGTTCCAT
1.72_552467	FORWARD	20	60.01	60.00	CCGTCTCGACGAAGAGTAG
1.72_552467	REVERSE	20	60.99	50.00	CGAATGAGCCCCAATCTACA
1.8_1767503	FORWARD	19	59.47	42.11	GCATCCGCCATTATGAAAA
1.8_1767503	REVERSE	20	59.80	45.00	TCACATCCAAATCTGCTTCG
1.8_2653523	FORWARD	21	59.30	47.62	GCTCGATCAACTCATCAACCT
1.8_2653523	REVERSE	20	60.15	45.00	AACAAGTCGGCCAAACAAAAG
1.8_2944433	FORWARD	20	59.44	50.00	CTTCACTTCGCTTGTGATGG
1.8_2944433	REVERSE	19	59.98	52.63	GAACTGTTTCGACGGCTTCA
1.83_45429	FORWARD	19	60.25	57.89	GATGTGGCGAGCTGAGAGA
1.83_45429	REVERSE	20	61.64	50.00	ATGCGCAGTAGCACCATCAT
1.89_310701	FORWARD	20	60.18	50.00	GGCTAACCCCCAAAAGGTA
1.89_310701	REVERSE	21	60.12	42.86	TTCGAGAGCTTCTGTCCAAA
1.9_1295185	FORWARD	20	59.45	50.00	ATGGTTCGCTGTGGTGTATG
1.9_1295185	REVERSE	19	60.37	57.89	AGCAGGAGGCTCAATGGAC
1.9_2581958	FORWARD	20	60.27	55.00	ATGGTCGACACTTGCCTCTC
1.9_2581958	REVERSE	22	59.22	45.45	GATGAAGTGATCGAGTTGTCGT
1.9_3123848	FORWARD	20	59.79	50.00	GTCGACAACGATCGAGATGA

1.9_3123848	REVERSE	20	58.65	40.00	TCTTCGCAGCTTCCAAAATA
1.9_3721006	FORWARD	20	60.27	55.00	AGTTCCTGGATGACGCTGAC
1.9_3721006	REVERSE	20	60.25	50.00	AGCGAACCAATTGGTCCTCTG
1.9_3795561	FORWARD	21	59.37	42.86	CGTTCGGGTCAAATAATACG
1.9_3795561	REVERSE	21	59.77	47.62	GAACAAACCTGCTTGAAGTGG
1.95_137980	FORWARD	20	59.52	50.00	CCTCGCGTTAAGACGAGTT
1.95_137980	REVERSE	20	59.99	45.00	CAAAGAGAAATGCAGCACCA

Oligonucleótidos utilizados en el servicio MonsterPlex para amplificar los 98 blancos moleculares para el análisis de secuenciación de amplicones. Se lista la posición respecto del genoma de referencia, la orientación del *primer*, largo, temperatura de annealing, %GC y secuencia de los *primers*.

BIBLIOGRAFÍA

Abreha, Kibrom B., Åsa Lankinen, Laura Masini, Sofia Hydbom, and Erik Andreasson. 'Late Blight Resistance Screening of Major Wild Swedish Solanum Species: *S. Dulcamara*, *S. Nigrum*, and *S. Physalifolium*'. *Phytopathology*® 108, no. 7 (2018): 847–57. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-17-0355-R>.

Abuley, Isaac K., James S. Lynott, Jens G. Hansen, David E. L. Cooke, y Alison K. Lees. «The EU43 Genotype of *Phytophthora Infestans* Displays Resistance to Mandipropamid». *Plant Pathology* 72, n.º 7 (2023): 1305-13. <https://doi.org/10.1111/ppa.13737>.

Ahn, Hee-Kyung, Xiao Lin, Andrea Carolina Olave-Achury, Lida Derevnina, Mauricio P Contreras, Jiorgos Kourelis, Chih-Hang Wu, Sophien Kamoun, and Jonathan D G Jones. 'Effector-dependent Activation and Oligomerization of Plant NRC Class Helper NLRs by Sensor NLR Immune Receptors Rpi-amr3 and Rpi-amr1'. *The EMBO Journal* 42, no. 5 (2023): e111484. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111484>.

Allen, Rebecca L., Julia C. Meitz, Rachel E. Baumber, Sharon A. Hall, Sarah C. Lee, Laura E. Rose, y Jim L. Beynon. «Natural Variation Reveals Key Amino Acids in a Downy Mildew Effector That Alters Recognition Specificity by an Arabidopsis Resistance Gene». *Molecular Plant Pathology* 9, n.º 4 (2008): 511-23. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00481.x>.

Andreu, Adriana B., Daniel O. Caldiz, y Gregory A. Forbes. «Phenotypic Expression of Resistance to *Phytophthora Infestans* in Processing Potatoes in Argentina». *American Journal of Potato Research* 87, n.º 2 (2010): 177-87. <https://doi.org/10.1007/s12230-009-9121-z>.

Armstrong, Miles R., Stephen C. Whisson, Leighton Pritchard, Jorunn I. B. Bos, Eduard Venter, Anna O. Avrova, Anne P. Rehmany, et al. «An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, n.o 21 (2005): 7766-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500113102>.

Armstrong, Miles R., Jack Vossen, Tze Yin Lim, Ronald C. B. Hutten, Jianfei Xu, Shona M. Strachan, Brian Harrower, Nicolas Champouret, Eleanor M. Gilroy, and Ingo Hein. 'Tracking Disease Resistance Deployment in Potato Breeding by Enrichment Sequencing'. (2018). <https://doi.org/10.1111/pbi.12997>.

Aylor, Donald E., William E. Fry, Hilary Mayton, y Jorge L. Andrade-Piedra. «Quantifying the Rate of Release and Escape of *Phytophthora Infestans* Sporangia from a Potato Canopy».

Phytopathology® 91, n.º 12 (2001): 1189-96.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.12.1189>.

Bebber, Daniel P., T. Holmes, D. Smith, S. J. Gurr. «Economic and Physical Determinants of the Global Distributions of Crop Pests and Pathogens». *New Phytologist* 202 (2014): 901-10.
<https://doi.org/10.1111/nph.12722>.

Belkhadir, Youssef, Li Yang, Jonathan Hetzel, Jeffery L. Dangl, y Joanne Chory. «The Growth–Defense Pivot: Crisis Management in Plants Mediated by LRR-RK Surface Receptors». *Trends in Biochemical Sciences* 39, n.º 10 (2014): 447-56.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.006>.

Beninal, Lyes, Zouaoui Bouznad, Roselyne Corbière, Sihem Belkhiter, Romain Mabon, Abdelmoumen Taoutaou, Abdelaziz Keddad, Eve Runno-Paurson, y Didier Andrivon. «Distribution of Major Clonal Lineages EU_13_A2, EU_2_A1, and EU_23_A1 of *Phytophthora infestans* Associated with Potato Late Blight across Crop Seasons and Regions in Algeria». *Plant Pathology* 71, n.o 2 (2022): 458-69. <https://doi.org/10.1111/ppa.13471>.

Bi, Su M, Li N, Liang Y, Dang S, Xu J, Hu M, et al. «The ZAR1 Resistosome Is a Calcium-Permeable Channel Triggering Plant Immune Signaling». *Cell* 184, n.º 13 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.003>.

Bigeard, Jean, Jean Colcombet, y Heribert Hirt. «Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI)». *Molecular Plant* 8, n.º 4 (2015): 521-39.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.

Birch, Paul R. J., Miles Armstrong, Jorunn Bos, Petra Boevink, Eleanor M. Gilroy, Rosalind M. Taylor, Stephan Wawra, et al. «Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*». *Journal of Experimental Botany* 60, n.º 4 (2009): 1133-40. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern353>.

Boevink, Petra C., Paul R. J. Birch, Dionne Turnbull, y Stephen C. Whisson. «Devastating Intimacy: The Cell Biology of Plant–*Phytophthora* Interactions». *New Phytologist* 228, n.º 2 (2020): 445-58. <https://doi.org/10.1111/nph.16650>.

Bonardi, Tang S, Stallmann A, Roberts M, Cherkis K, y Dangl JI. «Expanded Functions for a Family of Plant Intracellular Immune Receptors beyond Specific Recognition of Pathogen

Effectors». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n.º 39 (2011). <https://doi.org/10.1073/pnas.1113726108>.

Bonierbale M, Burgos G, zum Felde T, Sosa P. «Composition nutritionnelle des pommes de terre. Cahiers de nutrition et diététique» (2010) 45:S28–S36

Botero, David, Iván Valdés, María-Juliana Rodríguez, Diana Henao, Giovanna Danies, Andrés F. González, y Silvia Restrepo. «A Genome-Scale Metabolic Reconstruction of *Phytophthora* Infestans With the Integration of Transcriptional Data Reveals the Key Metabolic Patterns Involved in the Interaction of Its Host». *Frontiers in Genetics* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00244>.

Boutrot, Freddy, y Cyril Zipfel. «Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance». *Annual Review of Phytopathology* 55, n.º Volume 55, 2017 (2017): 257-86. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>.

Bouzo, C.A., «El cultivo de la Papa en Argentina» Documento publicado en el marco del Curso Cultivos Intensivos II, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Litoral, Argentina., 2009.

Bozkurt, Tolga O., y Sophien Kamoun. «The plant–pathogen haustorial interface at a glance». Editado por Ana-Maria Lennon-Duménil. *Journal of Cell Science* 133, n.º 5 (2020): jcs237958. <https://doi.org/10.1242/jcs.237958>.

Bradshaw, John E., Barnaly Pande, Glenn J. Bryan, Christine A. Hackett, Karen McLean, Helen E. Stewart, y Robbie Waugh. «Interval Mapping of Quantitative Trait Loci for Resistance to Late Blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], Height and Maturity in a Tetraploid Population of Potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*)». *Genetics* 168, n.º 2 (2004): 983-95. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.030056>.

Brasier, C. M., and Eva Sansome. 'Diploidy and Gametangial Meiosis in *Phytophthora Cinnamomi*, *P. Infestans* and *P. Drechsleri*'. *Transactions of the British Mycological Society* 65, no. 1 (1975): 49-IN15. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80180-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80180-X).

Bravo-Almonacid, Fernando, Valeria Rudoy, Bjorn Welin, María Eugenia Segretin, María Cecilia Bedogni, Fabiana Stolicz, Marcelo Criscuolo, et al. «Field Testing, Gene Flow Assessment and Pre-Commercial Studies on Transgenic *Solanum Tuberosum* Spp.

Tuberosum (Cv. Spunta) Selected for PVY Resistance in Argentina». *Transgenic Research* 21, n.º 5 (2012): 967-82. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9584-9>.

Bruvo, Ružica, Nicolaas K. Michiels, Thomas G. D'souza, y Hinrich Schulenburg. «A Simple Method for the Calculation of Microsatellite Genotype Distances Irrespective of Ploidy Level». *Molecular Ecology* 13, n.º 7 (2004): 2101-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>.

Brylińska, M., S. Sobkowiak, E. Stefańczyk, y J. Śliwka. «Potato cultivation system affects population structure of *Phytophthora infestans*». *Fungal Ecology* 20 (2016): 132-43. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.01.001>.

Byarugaba, Arinaitwe Abel, Gerald Baguma, Douglas Mutebi Jjemba, Aharinta Kenneth Faith, Arthur Wasukira, Eric Magembe, Anne Njoroge, Alex Barekye, and Marc Ghislain. 'Comparative Phenotypic and Agronomic Assessment of Transgenic Potato with 3R-Gene Stack with Complete Resistance to Late Blight Disease'. *Biology* 10, no. 10 (2021): 952. <https://doi.org/10.3390/biology10100952>.

Caldiz, D.O. «Producción, Cosecha y Almacenamiento de Papa en la Argentina». 2nd Edition, McCain Argentina SA, Balcarce - BASF Argentina SA, (2007) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Cano, Liliana, Sophien Kamoun, and Joe Win. 'The Effector Secretome of the Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora Infestans*'. Zenodo (2019). <https://doi.org/10.5281/zenodo.3574589>.

CASAFE 2012. Disponible en el vínculo <https://www.casafe.org/pdf/2015/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitario-2012.pdf>

Catal, Mursel, Louis King, Pavani Tumbalam, Prissana Wiriyajitsomboon, William W. Kirk, and Gerard C. Adams. 'Heterokaryotic Nuclear Conditions and a Heterogeneous Nuclear Population Are Observed by Flow Cytometry in *Phytophthora Infestans*'. *Cytometry Part A* 77A, no. 8 (2010): 769–75. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20888>.

Chen, Yu, y Dennis A. Halterman. «*Phytophthora Infestans* Effectors IPI-O1 and IPI-O4 Each Contribute to Pathogen Virulence». *Phytopathology*® 107, n.º 5 (2017): 600-606. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0240-R>.

Chowdappa, Pallem, Nirmal B. J. Kumar, Shivanna Madhura, Mohan S. P. Kumar, Kevin L. Myers, William E. Fry, Julie N. Squires, y David E. L. Cooke. «Emergence of 13_A2 Blue Lineage of *Phytophthora Infestans* Was Responsible for Severe Outbreaks of Late Blight on Tomato in South-West India». *Journal of Phytopathology* 161, n.º 1 (2012): 49-58. <https://doi.org/10.1111/jph.12031>.

Contreras, Mauricio P, Hsuan Pai, Yasin Tumtas, Cian Duggan, Enoch Lok Him Yuen, Angel Vergara Cruces, Jiorgos Kourelis, et al. 'Sensor NLR Immune Proteins Activate Oligomerization of Their NRC Helpers in Response to Plant Pathogens'. *The EMBO Journal* 42, no. 5 (2023): e111519. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111519>.

Contreras, Mauricio P., Hsuan Pai, Rebecca Thompson, Clemence Marchal, Jules Claeys, Hiroaki Adachi, and Sophien Kamoun. 'The Nucleotide-Binding Domain of NRC-Dependent Disease Resistance Proteins Is Sufficient to Activate Downstream Helper NLR Oligomerization and Immune Signaling'. *New Phytologist* 243, no. 1 (2024): 345–61. <https://doi.org/10.1111/nph.19818>.

Cooke, David E. L., Liliana M. Cano, Sylvain Raffaele, Ruairidh A. Bain, Louise R. Cooke, Graham J. Etherington, Kenneth L. Deahl, et al. «Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen». *PLOS Pathogens* 8, n.º 10 (2012): e1002940. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002940>.

Coomber, Allison, Amanda Saville, y Jean Beagle Ristaino. «Evolution of *Phytophthora Infestans* on Its Potato Host since the Irish Potato Famine». *Nature Communications* 15, n.º 1 (2024): 6488. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50749-4>.

Cucak, Mladen, Rafael de Andrade Moral, Rowan Fealy, Keith Lambkin, y Steven Kildea. «Opportunities for Improved Potato Late Blight Management in the Republic of Ireland: Field Evaluation of the Modified Irish Rules Crop Disease Risk Prediction Model». *Phytopathology*® 111, n.º 8 (2021): 1349-60. <https://doi.org/10.1094/PHTO-01-20-0011-R>.

Dangi, Sandesh, Phillip Wharton, Alberta D. Ambarwati, Tri Joko Santoso, Kusmana, Ineu Sulastrini, John Medendorp, Karen Hokanson, y David Douches. «Genotypic and Phenotypic Characterization of *Phytophthora Infestans* Populations on Java, Indonesia». *Plant Pathology* 70, n.º 1 (2021): 61-73. <https://doi.org/10.1111/ppa.13269>.

Danies, Giovanna, Kevin Myers, María F. Mideros, Silvia Restrepo, Frank N. Martin, David E. L. Cooke, Christine D. Smart, et al. «An Ephemeral Sexual Population of Phytophthora Infestans in the Northeastern United States and Canada». *PLOS ONE* 9, n.º 12 (2014): e116354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116354>.

Derevnina, Lida, Sophien Kamoun, and Chih-hang Wu. 'Dude, Where Is My Mutant? Nicotiana Benthamiana Meets Forward Genetics'. *New Phytologist* 221, no. 2 (2019): 607–10. <https://doi.org/10.1111/nph.15521>.

Derevnina, Lida, Mauricio P. Contreras, Hiroaki Adachi, Jessica Upson, Angel Vergara Cruces, Rongrong Xie, Jan Sklenar, et al. «Plant Pathogens Convergently Evolved to Counteract Redundant Nodes of an NLR Immune Receptor Network». *PLOS Biology* 19, n.º 8 (2021): e3001136. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001136>.

Devaux, André, Jean-Pierre Goffart, Peter Kromann, Jorge Andrade-Piedra, Vivian Polar, and Guy Hareau. 'The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-Food Systems'. *Potato Research* 64, no. 4 (2021): 681–720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>.

Dodds, Peter N., y John P. Rathjen. «Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant–Pathogen Interactions». *Nature Reviews Genetics* 11, n.º 8 (agosto de 2010): 539-48. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.

Dong, Suomeng, Remco Stam, Liliana M. Cano, Jing Song, Jan Sklenar, Kentaro Yoshida, Tolga O. Bozkurt, et al. «Effector Specialization in a Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen». *Science* 343, n.º 6170 (2014): 552-55. <https://doi.org/10.1126/science.1246300>.

Dong, Suomeng, Sylvain Raffaele, y Sophien Kamoun. «The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants». *Current Opinion in Genetics & Development, Genomes and evolution*, 35 (2015): 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.09.001>.

Dong, O. X., & Ronald, P. C. (2019). Genetic engineering for disease resistance in plants: Recent progress and future perspectives. *Plant Physiology*, 180*(1), 26–38. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01224>

Dou, D. L., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H. Y., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., Zhang, X. M., and Tyler, B. M.. RXLR-mediated entry of Phytophthora sojae effector Avr1b into soybean

cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* (2008) 20:1930-1947.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.056093>

Du, Y., R. Weide, Z. Zhao, P. Msimuko, F. Govers, y K. Bouwmeester. «RXLR effector diversity in *Phytophthora infestans* isolates determines recognition by potato resistance proteins; the case study AVR1 and R1». *Studies in Mycology* 89 (2018): 85-93.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.003>.

Edmonds, Jennifer M., y James A. Chweya. «*Black Nightshades: Solanum Nigrum L. and Related Species*. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops» (1997). 15. Rome: IPGRI.

Eitas, Timothy K, y Jeffery L Dangl. «NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways». *Current Opinion in Plant Biology* 13, n.º 4 (2010): 472-77.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.007>.

Elshire, Robert J., Jeffrey C. Glaubitz, Qi Sun, Jesse A. Poland, Ken Kawamoto, Edward S. Buckler, y Sharon E. Mitchell. «A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species». *PLOS ONE* 6, n.º 5 (2011): e19379.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>.

Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. «Phytophthora Diseases Worldwide». *Plant Pathology* 47, n.º 2 (1998): 224-25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.0179a.x>.

FAO, How to Feed the World in 2050. 2009.

Fabro, Georgina. «Oomycete Intracellular Effectors: Specialised Weapons Targeting Strategic Plant Processes». *New Phytologist* 233, n.º 3 (2022): 1074-82.
<https://doi.org/10.1111/nph.17828>.

Fay, Justin C., y William E. Fry. «Effects of Hot and Cold Temperatures on the Survival of Oospores Produced by United States Strains of *Phytophthora Infestans*». *American Potato Journal* 74, n.º 5 (1997): 315-23. <https://doi.org/10.1007/BF02851575>.

Figueroa-Grenett, Franco, Erika X. Briceño, Iván Maureira-Butler, and Anita Behn. 'Assessment of Resistance to Late Blight (*Phytophthora Infestans* (Mont.) de Bary) in Chilean

Native Potatoes (*Solanum Tuberosum Chilotanum* Group)'. *Potato Research*, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11540-024-09779-0>.

Fisher, Matthew C., Daniel. A. Henk, Cheryl J. Briggs, John S. Brownstein, Lawrence C. Madoff, Sarah L. McCraw, y Sarah J. Gurr. «Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health». *Nature* 484 (2012): 186-94. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.

Fontagro - <https://www.fontagro.org/new/proyectos/alerta-temprana-para-el-manejo-del-tizon-tardio-d>

Forbes, Gregory A., Stephen B. Goodwin, André Drenth, Pedro Oyarzun, Maria Eugenia Ordoñez, and William E. Fry. 'A Global Marker Database for *Phytophthora Infestans*'. *Plant Disease* 82, no. 7 (1998): 811–18. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.811>.

Frantzeskakis, Lamprinos, Stefan Kusch, y Ralph Panstruga. «The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens». *Molecular Plant Pathology* 20, n.º 1 (2019): 3-7. <https://doi.org/10.1111/mpp.12738>.

Fry, William E., y Stephen B. Goodwin. «Re-Emergence of Potato and Tomato Late Blight in the United States». *Plant Disease* 81, n.º 12 (1997): 1349-57. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1349>.

Fry, William. «Phytophthora Infestans: The Plant (and R Gene) Destroyer». *Molecular Plant Pathology* 9, n.º 3 (2008): 385-402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>.

Fry, W. E., P. R. J. Birch, H. S. Judelson, N. J. Grünwald, G. Danies, K. L. Everts, A. J. Gevens, et al. «Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen». *Phytopathology*® 105, n.º 7 (2015): 966-81. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0005-FI>.

Fry, William E. «Phytophthora Infestans: The Itinerant Invader; “Late Blight”: The Persistent Disease». *Phytoparasitica* 48, n.º 1 (2020): 87-94. <https://doi.org/10.1007/s12600-019-00778-3>.

Garrett, K. A., M. Nita, E. D. De Wolf, P. D. Esker, L. Gomez-Montano, y A. H. Sparks. «Chapter 24 - Plant pathogens as indicators of climate change». En *Climate Change (Third Edition)*, editado por Trevor M. Letcher, 499-513. Elsevier, (2021). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821575-3.00024-4>.

Geber, Jonny, Monica Tromp, Ashley Scott, Abigail Bouwman, Paolo Nanni, Jonas Grossmann, Jessica Hendy, y Christina Warinner. «Relief food subsistence revealed by microparticle and proteomic analyses of dental calculus from victims of the Great Irish Famine». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, n.º 39 (2019): 19380-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908839116>.

Ghislain, Marc, Arinaitwe Abel Byarugaba, Eric Magembe, Anne Njoroge, Cristina Rivera, María Lupe Román, José Carlos Tovar, et al. «Stacking Three Late Blight Resistance Genes from Wild Species Directly into African Highland Potato Varieties Confers Complete Field Resistance to Local Blight Races». *Plant Biotechnology Journal* 17, n.º 6 (2019): 1119-29. <https://doi.org/10.1111/pbi.13042>.

Gilroy, Eleanor M., Susan Breen, Stephen C. Whisson, Julie Squires, Ingo Hein, Maciej Kaczmarek, Dionne Turnbull, et al. «Presence/Absence, Differential Expression and Sequence Polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2-like in *Phytophthora infestans* Determine Virulence on R2 Plants». *New Phytologist* 191, n.º 3 (2011): 763-76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03736.x>.

Glazebrook, Jane. «Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens». *Annual Review of Phytopathology* 43, n.º Volume 43 (2005): 205-27. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>.

Goodwin SB, Cohen BA, Deahl KL, Fry WE. «Migration from northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada». *Phytopathology* (1994) 84: 553-558.

Griffith, Gareth W., y David S. Shaw. «Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions». *Applied and Environmental Microbiology* 64, n.º 10 (1998): 4007-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.4007-4014.1998>.

Gu, Biao, Wenxin Gao, Zeqi Liu, Guangda Shao, Qin Peng, Yinyu Mu, Qinhu Wang, Hua Zhao, Jianqiang Miao, y Xili Liu. «A single region of the *Phytophthora infestans* avirulence effector Avr3b functions in both cell death induction and plant immunity suppression». *Molecular Plant Pathology* 24, n.º 4 (2023): 317-30. <https://doi.org/10.1111/mpp.13298>.

Guha Roy, Sanjoy, Tanmoy Dey, David E. L. Cooke, y Louise R. Cooke. «The Dynamics of *Phytophthora Infestans* Populations in the Major Potato-growing Regions of Asia – A Review». *Plant Pathology* 70, n.º 5 (2021): 1015-31. <https://doi.org/10.1111/ppa.13360>.

Haas, Brian J., Sophien Kamoun, Michael C. Zody, Rays H. Y. Jiang, Robert E. Handsaker, Liliana M. Cano, Manfred Grabherr, et al. «Genome Sequence and Analysis of the Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora Infestans*». *Nature* 461, n.º 7262 (2009): 393-98. <https://doi.org/10.1038/nature08358>.

Haesaert, Geert, Jack H. Vossen, René Custers, Marc De Loose, Anton Haverkort, Betty Heremans, Ronald Hutten, et al. 'Transformation of the Potato Variety Desiree with Single or Multiple Resistance Genes Increases Resistance to Late Blight under Field Conditions'. *Crop Protection* 77 (1 November 2015): 163–75. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.018>.

Haverkort, A. J., P. C. Struik, R. G. F. Visser, y E. Jacobsen. «Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora Infestans*». *Potato Research* 52, n.º 3 (2009): 249-64. <https://doi.org/10.1007/s11540-009-9136-3>.

Herlithy, John, Nora R. Ludwig, Guido van den Ackerveken, y John M. McDowell. «Oomycetes Used in Arabidopsis Research». *The Arabidopsis Book* 17 (2019): e0188. <https://doi.org/10.1199/tab.0188>.

Hou, Yingnan, and Wenbo Ma. 'Natural Host-Induced Gene Silencing Offers New Opportunities to Engineer Disease Resistance'. *Trends in Microbiology* 28, no. 2 (2020): 109–17. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.009>.

Hu, Zehan, & Jijie Chai. «Assembly and Architecture of NLR Resistosomes and Inflammasomes». *Annual Review of Biophysics* 52 (2023): 207-28. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-092922-073050>.

Huarte, M., Capezio, S. «"Cultivo de Papa." Agricultura y ganadería pampeanas», (2013) 172-202.

Jiang, Xiaoqian, Baolin Mu, Zhuoran Huang, Mingjing Zhang, Xiaojuan Wang, and Shiheng Tao. 'Impacts of Mutation Effects and Population Size on Mutation Rate in Asexual Populations: A Simulation Study'. *BMC Evolutionary Biology* 10, no. 1 (2010): 298. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-298>.

Jones, Jonathan D. G., Kamil Witek, Walter Verweij, Florian Jupe, David Cooke, Stephen Dorling, Laurence Tomlinson, Matthew Smoker, Sara Perkins, and Simon Foster. 'Elevating Crop Disease Resistance with Cloned Genes'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, no. 1639 (2014): 20130087.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0087>.

Jones, Jonathan D. G., Russell E. Vance, y Jeffery L. Dangl. «Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals». *Science* 354, n.º 6316 (2016): aaf6395.

<https://doi.org/10.1126/science.aaf6395>.

Jubic, Saile S, Furzer Oj, El Kasmi F, y Dangl JI. «Help Wanted: Helper NLRs and Plant Immune Responses». *Current Opinion in Plant Biology* 50 (2019).

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.013>.

Kamoun, Sophien. «A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes». *Annual Review of Phytopathology* 44, n.º 1 (2006): 41-60.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>.

Kamoun, Sophien, Oliver Furzer, Jonathan D. G. Jones, Howard S. Judelson, Gul Shad Ali, Ronaldo J. D. Dalio, Sanjoy Guha Roy, et al. «The Top 10 Oomycete Pathogens in Molecular Plant Pathology». *Molecular Plant Pathology* 16, n.º 4 (2015): 413-34.

<https://doi.org/10.1111/mpp.12190>.

Kaschani, Farnusch, Mohammed Shabab, Tolga Bozkurt, Takayuki Shindo, Sebastian Schornack, Christian Gu, Muhammad Ilyas, Joe Win, Sophien Kamoun, y Renier A.L. van der Hoorn. «An Effector-Targeted Protease Contributes to Defense against *Phytophthora infestans* and Is under Diversifying Selection in Natural Hosts». *Plant Physiology* 154, n.º 4 (2010): 1794-1804. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158030>.

Kaur, Simardeep, Mahesh Kumar Samota, Manoj Choudhary, Mukesh Choudhary, Abhay K. Pandey, Anshu Sharma, and Julie Thakur. 'How Do Plants Defend Themselves against Pathogens-Biochemical Mechanisms and Genetic Interventions'. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 28, no. 2 (2022): 485–504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>.

Kirk, William W. «Thermal Properties of Overwintered Piles of Cull Potatoes». *American Journal of Potato Research* 80, n.º 2 (2003): 145-49. <https://doi.org/10.1007/BF02870214>.

Knaus, Brian J., Javier F. Tabima, Shankar K. Shakya, Howard S. Judelson, y Niklaus J. Grünwald. «Genome-Wide Increased Copy Number is Associated with Emergence of Dominant Clones of the Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans*». *mBio* 11, n.º 3 (2019): 10.1128/mbio.00326-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.00326-20>.

Kourelis, Jiorgos, Toshiyuki Sakai, Hiroaki Adachi, y Sophien Kamoun. «RefPlantNLR Is a Comprehensive Collection of Experimentally Validated Plant Disease Resistance Proteins from the NLR Family». *PLOS Biology* 19, n.º 10 (2021): e3001124. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001124>.

Křížková, Bára, Jitka Viktorová, y Jan Lipov. «Approved Genetically Modified Potatoes (*Solanum tuberosum*) for Improved Stress Resistance and Food Safety». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70, n.º 38 (2022): 11833-43. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03837>.

Lee, Yoonyoung, Kwang-Soo Cho, Jin-Hee Seo, Kee Hoon Sohn, y Maxim Prokchorchik. «Improved Genome Sequence and Gene Annotation Resource for the Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans*». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 33, n.º 8 (2020): 1025-28. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-20-0023-A>.

Letunic, Ivica, y Peer Bork. «Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool». *Nucleic Acids Research* 52, n.º W1 (2024): W78-82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>.

Li, Y, T A J van der Lee, A Evenhuis, G B M van den Bosch, P J van Bekkum, M G Förch, M P E van Gent-Pelzer, et al. «Population Dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands Reveals Expansion and Spread of Dominant Clonal Lineages and Virulence in Sexual Offspring». *G3 Genes/Genomes/Genetics* 2, n.º 12 (2012): 1529-40. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004150>.

Li, Ying, David E. L. Cooke, Evert Jacobsen, y Theo van der Lee. «Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*». *Journal of Microbiological Methods* 92, n.º 3 (2013): 316-22. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.021>.

Li, Lei, Yufei Yu, Zhaoyang Zhou, y Jian-Min Zhou. «Plant Pattern-Recognition Receptors Controlling Innate Immunity». *Science China Life Sciences* 59, n.º 9 (2016): 878-88. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0115-2>.

Liao, Chao-Jan, Sara Hailemariam, Amir Sharon, and Tesfaye Mengiste. 'Pathogenic Strategies and Immune Mechanisms to Necrotrophs: Differences and Similarities to Biotrophs and Hemibiotrophs'. *Current Opinion in Plant Biology* 69 (2022): 102291. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102291>.

Lin, Xiao, Tianqiao Song, Sebastian Fairhead, Kamil Witek, Agathe Jouet, Florian Jupe, Agnieszka Witek, et al. «Identification of Avramr1 from *Phytophthora infestans* Using Long Read and CDNA Pathogen-Enrichment Sequencing (PenSeq)». *Molecular Plant Pathology* 21, n.o 11 (2020): 1502-12. <https://doi.org/10.1111/mpp.12987>.

Liu, Qiang, Richard Tarn, Dermot Lynch, y Neil M. Skjoldt. «Physicochemical properties of dry matter and starch from potatoes grown in Canada». *Food Chemistry* 105, n.º 3 (2007): 897-907. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.034>.

Lucca, María Florencia, Huarte, Marcelo. «Genotyping variation in *Phytophthora infestans* populations in Argentina». Thirteenth EuroBlight workshop (2011):201-204.

Maruta, Natsumi, Hayden Burdett, Bryan Y. J. Lim, Xiahao Hu, Sneha Desa, Mohammad Kawsar Manik, y Bostjan Kobe. «Structural basis of NLR activation and innate immune signalling in plants». *Immunogenetics* 74, n.º 1 (2022): 5-26. <https://doi.org/10.1007/s00251-021-01242-5>.

Maurice, Sundy, Melanie S. Montes, Bent J. Nielsen, Lars Bødker, Michael D. Martin, Carina G. Jønck, Rasmus Kjøller, y Søren Rosendahl. «Population Genomics of an Outbreak of the Potato Late Blight Pathogen, *Phytophthora infestans*, Reveals Both Clonality and High Genotypic Diversity». *Molecular Plant Pathology* 20, n.º 8 (2019): 1134-46. <https://doi.org/10.1111/mpp.12819>.

Mayton, H., C. D. Smart, B. C. Moravec, E. S. G. Mizubuti, A. E. Muldoon, y W. E. Fry. «Oospore Survival and Pathogenicity of Single Oospore Recombinant Progeny from a Cross Involving US-17 and US-8 Genotypes of *Phytophthora infestans*». *Plant Disease* 84, n.º 11 (2000): 1190-96. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.11.1190>.

McDonald, Bruce A., y Celeste Linde. «Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance ». *Annual Review of Phytopathology* 40, n.º 1 (2002): 349-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>.

Melhus, I.E. «*Germination and infection with the fungus of the late blight of potato (Phytophthora infestans)* ». Madison, WI: University of Wisconsin, (1915) Agr. Exp. Sta.

Meldau, Stefan, Matthias Erb, y Ian T. Baldwin. «Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns». *Annals of Botany* 110, n.º 8 (2012): 1503-14. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs212>.

Miller, P, «Multilingual Compendium of Plant Diseases». Am. Phytopathol. Soc., St. Paul Minnesota, 1976.

Monteiro, Freddy, and Marc T. Nishimura. 'Structural, Functional, and Genomic Diversity of Plant NLR Proteins: An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity'. *Annual Review of Phytopathology* 56, no. Volume 56, 2018 (2018): 243–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045817>.

Moscou, Matthew J., y H. Peter van Esse. «The quest for durable resistance». *Science* 358, n.º 6370 (22 de diciembre de 2017): 1541-42. <https://doi.org/10.1126/science.aar4797>.

Mukhtar, M. Shahid, Anne-Ruxandra Carvunis, Matija Dreze, Petra Epple, Jens Steinbrenner, Jonathan Moore, Murat Tasan, et al. «Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network». *Science* 333, n.º 6042 (2011): 596-601. <https://doi.org/10.1126/science.1203659>.

Mundt, Christopher C. 'Durable Resistance: A Key to Sustainable Management of Pathogens and Pests'. *Infection, Genetics and Evolution* 27 (2014): 446–55. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.011>.

Nassar, Atef M. K., Kebba Sabally, Stan Kubow, Yves N. Leclerc, y Danielle J. Donnelly. «Some Canadian-Grown Potato Cultivars Contribute to a Substantial Content of Essential Dietary Minerals». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, n.º 18 (2012): 4688-96. <https://doi.org/10.1021/jf204940t>.

Ngou, Bruno Pok Man, Hee-Kyung Ahn, Pingtao Ding, y Jonathan D. G. Jones. «Mutual Potentiation of Plant Immunity by Cell-Surface and Intracellular Receptors». *Nature* 592, n.º 7852 (2021): 110-15. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>.

Ngou, Bruno Pok Man, Jonathan D. G. Jones, y Pingtao Ding. «Plant immune networks». *Trends in Plant Science* 27, n.º 3 (2022): 255-73. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.012>.

Njoroge, Anne W., Björn Andersson, Alison K. Lees, Collins Mutai, Gregory A. Forbes, Jonathan E. Yuen, y Roger Pelle. «Genotyping of *Phytophthora infestans* in Eastern Africa Reveals a Dominating Invasive European Lineage». *Phytopathology*® 109, n.º 4 (2019): 670-80. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0234-R>.

Nürnberg, T., & Brunner, F.. «Innate immunity in plants and animals: Emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns». *Current Opinion in Plant Biology*, (2002) 5(4), 318–324. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00265-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00265-0)

Oliva, Ricardo F., Liliana M. Cano, Sylvain Raffaele, Joe Win, Tolga O. Bozkurt, Khaoula Belhaj, Sang-Keun Oh, Marco Thines, y Sophien Kamoun. «A Recent Expansion of the RXLR Effector Gene *Avrblb2* Is Maintained in Global Populations of *Phytophthora infestans* Indicating Different Contributions to Virulence». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 28, n.º 8 (2015): 901-12. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0393-R>.

Olivoto, Tiago. «Lights, Camera, Pliman! An R Package for Plant Image Analysis». *Methods in Ecology and Evolution* 13, n.º 4 (2022): 789-98. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13803>.

Onda, Yoshihiko, Kotaro Takahagi, Minami Shimizu, Komaki Inoue, y Keiichi Mochida. «Multiplex PCR Targeted Amplicon Sequencing (MTA-Seq): Simple, Flexible, and Versatile SNP Genotyping by Highly Multiplexed PCR Amplicon Sequencing». *Frontiers in Plant Science* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00201>.

Orbegozo, Jeanette, Maria Lupe Roman, Cristina Rivera, Soledad Gamboa, Jose Carlos Tovar, Gregory A. Forbes, Hannele Lindqvist-Kreuze, Jan F. Kreuze, y Marc Ghislain. «*Rpi-Blb2* Gene from *Solanum bulbocastanum* Confers Extreme Resistance to Late Blight Disease in Potato». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 125, n.º 2 (2016): 269-81. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0947-z>.

Pais, Marina, Kentaro Yoshida, Artemis Giannakopoulou, Mathieu A. Pel, Liliana M. Cano, Ricardo F. Oliva, Kamil Witek, Hannele Lindqvist-Kreuze, Vivianne G. A. A. Vleeshouwers, y Sophien Kamoun. «Gene expression polymorphism underpins evasion of host immunity in an asexual lineage of the Irish potato famine pathogen». *BMC Evolutionary Biology* 18, n.º 1 (2018): 93. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1201-6>.

Palchetti, María Virginia, Juan José Cantero, and Gloria Estela Barboza. 'Solanaceae Diversity in South America and Its Distribution in Argentina'. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 92 (2020): e20190017. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190017>

Raffaele, Sylvain, Joe Win, Liliana M. Cano, and Sophien Kamoun. 'Analyses of Genome Architecture and Gene Expression Reveal Novel Candidate Virulence Factors in the Secretome of *Phytophthora Infestans*'. *BMC Genomics* 11, no. 1 (2010): 637. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-637>.

Reina-Pinto, J. J., & Yephremov, A. «Surface lipids and plant defenses». *Plant Physiology and Biochemistry*, (2009) 47(6), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.004>

Rodríguez Melo, Johan, Florencia Mammarella, and Federico Ariel. 'Exogenous RNAs: Promising Tools for the Second Green Revolution'. *Journal of Experimental Botany* 74, no. 7 (2023): 2323–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad023>.

Roehr, Johannes T, Christoph Dieterich, y Knut Reinert. «Flexbar 3.0 – SIMD and multicore parallelization». *Bioinformatics* 33, n.o 18 (2017): 2941-42. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx330>

Rowan, B.A., Seymour, D.K., Chae, E., Lundberg, D.S., Weigel, D. Methods for Genotyping-by-Sequencing. In: White, S., Cantsilieris, S. (eds) *Genotyping. Methods in Molecular Biology*, vol 1492. Humana Press,(2017). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0_16

Runno-Paurson, Eve, Triinu Remmel, Ann Ojarand, Alice Aav, y Marika Mänd. «The Structure of *Phytophthora Infestans* Populations from Organic and Conventional Crops». *European Journal of Plant Pathology* 128, n.º 3 (2010): 373-83. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9659-0>.

Runno-Paurson, Eve, Asko O. Hannukkala, Katrin Kotkas, Mati Koppel, Ingrid H. Williams, y Marika Mänd. «Impact of Phytosanitary Quality of Seed Potato and Temporal Epidemic

Progress on the Phenotypic Diversity of *Phytophthora infestans* Populations». *American Journal of Potato Research* 90, n.º 3 (2013): 245-54. <https://doi.org/10.1007/s12230-013-9299-y>.

Savary, S., S. Bregaglio, L. Willocquet, D. Gustafson, D. Mason D’Croz, A. Sparks, N. Castilla, et al. «Crop Health and Its Global Impacts on the Components of Food Security». *Food Security* 9, n.º 2 (2017): 311-27. <https://doi.org/10.1007/s12571-017-0659-1>.

Saville, Amanda C., Federico La Spada, Roberto Faedda, Quirico Migheli, Bruno Scanu, Paolo Ermacora, Giovanna Gilardi, et al. «Population Structure of *Phytophthora infestans* Collected on Potato and Tomato in Italy». *Plant Pathology* 70, n.º 9 (2021): 2165-78. <https://doi.org/10.1111/ppa.13444>.

Sokolova, E.A.; Kuznetsova, M.A.; Kozlovsky, B.E.; Beketova, M.P.; Malyuchenko, O.P.; Alekseev, Y.; Rogozina, E.V.; Khavkin, E.E. Virulence and aggressiveness of new *Phytophthora infestans* isolates collected in North-Western Russia as related to host plant resistance. *PPO Spec. Rep.* (2015), 17, 229.

Song, Junqi, James M. Bradeen, S. Kristine Naess, John A. Raasch, Susan M. Wielgus, Geraldine T. Haberlach, Jia Liu, et al. ‘Gene RB Cloned from *Solanum tuberosum* Confers Broad Spectrum Resistance to Potato Late Blight’. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, no. 16 (2003): 9128–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533501100>.

Song, Lulu, Liping Cui, Hao Li, Na Zhang, and Wenxiang Yang. ‘Wheat Leaf Rust Effector Pt48115 Localized in the Chloroplasts and Suppressed Wheat Immunity’. *Journal of Fungi* 11, no. 1 (2025): 80. <https://doi.org/10.3390/jof11010080>.

Sun, Yujing, Fan Liu, Mengzhu Zeng, Xinjie Zhang, Ying Cui, Zhaodan Chen, Lei Wang, et al. ‘The ETI-Dependent Receptor-like Kinase 1 Positively Regulates Effector-Triggered Immunity by Stabilizing NLR-Required for Cell Death 4 in *Nicotiana glauca*’. *New Phytologist* 242, no. 2 (2024): 576–91. <https://doi.org/10.1111/nph.19596>.

Thilliez, Gaetan J. A., Miles R. Armstrong, Tze-Yin Lim, Katie Baker, Agathe Jouet, Ben Ward, Cock van Oosterhout, et al. «Pathogen Enrichment Sequencing (PenSeq) Enables Population Genomic Studies in Oomycetes». *New Phytologist* 221, n.º 3 (2018): 1634-48. <https://doi.org/10.1111/nph.15441>.

Thorvaldsdóttir, Helga, James T. Robinson, y Jill P. Mesirov. «Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration». *Briefings in Bioinformatics* 14, n.º 2 (2013): 178-92. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.

Toghiani, AmirAli, Raoul Frijters, Tolga O. Bozkurt, Ryohei Terauchi, Sophien Kamoun, and Yu Sugihara. 'Can AI Modelling of Protein Structures Distinguish between Sensor and Helper NLR Immune Receptors?' bioRxiv, (2024). <https://doi.org/10.1101/2024.11.24.625045>.

Tooley PW, FryWE. «Genetic variation in *Phytophthora infestans* identified through isozyme analysis. *Phytopathology*» (1983) 73:827

Torto, Trudy, Shuang Li, Allison Styer, Edgar Huitema, Antonino Testa, Neil Gow, Pieter van West, y Sophien Kamoun. «EST Mining and Functional Expression Assays Identify Extracellular Effector Proteins From the Plant Pathogen *Phytophthora*». *Genome research* 13 (2003): 1675-85. <https://doi.org/10.1101/gr.910003>.

Turkensteen, L. J., W. G. Flier, R. Wanningen, y A. Mulder. «Production, Survival and Infectivity of Oospores of *Phytophthora infestans*». *Plant Pathology* 49, n.º 6 (2000): 688-96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00515.x>.

Tyler, Brett M., Sucheta Tripathy, Xuemin Zhang, Paramvir Dehal, Rays H. Y. Jiang, Andrea Aerts, Felipe D. Arredondo, et al. «*Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis». *Science* 313, n.º 5791 (2006): 1261-66. <https://doi.org/10.1126/science.1128796>.

Underwood, William. «The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion». *Frontiers in Plant Science* 3 (2012). <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>.

Van Dijk, Michiel, Tom Morley, Marie Luise Rau, y Yashar Saghai. «A Meta-Analysis of Projected Global Food Demand and Population at Risk of Hunger for the Period 2010–2050». *Nature Food* 2, n.º 7 (2021): 494-501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>.

Van Esse, H. Peter van, T. Lynne Reuber, y Dieuwertje van der Does. «Genetic Modification to Improve Disease Resistance in Crops». *New Phytologist* 225, n.º 1 (2020): 70-86. <https://doi.org/10.1111/nph.15967>

Van Der Vossen, Edwin, Anne Sikkema, Bas te Lintel Hekkert, Jack Gros, Patricia Stevens, Marielle Muskens, Doret Wouters, Andy Pereira, Willem Stiekema, y Sjefke Allefs. «An Ancient R Gene from the Wild Potato Species *Solanum Bulbocastanum* Confers Broad-Spectrum Resistance to *Phytophthora Infestans* in Cultivated Potato and Tomato». *The Plant Journal* 36, n.º 6 (2003): 867-82. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x>.

Van der Vossen, Edwin A.G. van der, Jack Gros, Anne Sikkema, Marielle Muskens, Doret Wouters, Petra Wolters, Andy Pereira, and Sjefke Allefs. 'The Rpi-Blb2 Gene from *Solanum Bulbocastanum* Is an Mi-1 Gene Homolog Conferring Broad-Spectrum Late Blight Resistance in Potato'. *The Plant Journal* 44, no. 2 (2005): 208–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x>.

Van Kempen, Michel, Stephanie S. Kim, Charlotte Tumescheit, Milot Mirdita, Jeongjae Lee, Cameron L. M. Gilchrist, Johannes Söding, and Martin Steinegger. 'Fast and Accurate Protein Structure Search with Foldseek'. *Nature Biotechnology* 42, no. 2 (2024): 243–46. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0>.

Vleeshouwers, Vivianne G.A.A., Sylvain Raffaele, Jack H. Vossen, Nicolas Champouret, Ricardo Oliva, Maria E. Segretin, Hendrik Rietman, et al. «Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors». *Annual Review of Phytopathology* 49, n.º 1 (2011): 507-31. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>.

Vleeshouwers, Vivianne G. A. A., y Richard P. Oliver. «Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens». *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 27, n.º 3 (2014): 196-206. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0313-IA>.

Wacker, Theresa, Nicolas Helmstetter, Duncan Wilson, Matthew C. Fisher, David J. Studholme, and Rhys A. Farrer. 'Two-Speed Genome Evolution Drives Pathogenicity in Fungal Pathogens of Animals'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120, no. 2 (2023): e2212633120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212633120>.

Waheed, Abdul, Yan-Ping Wang, Oswald Nkurikiyimfura, Wen-Yang Li, Shi-Ting Liu, Yahuza Lurwanu, Guo-Dong Lu, Zong-Hua Wang, Li-Na Yang, y Jiasui Zhan. «Effector Avr4 in *Phytophthora infestans* Escapes Host Immunity Mainly Through Early Termination». *Frontiers in Microbiology* 12 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.646062>.

Wang, Fengtao, Ruiming Lin, Jing Feng, Wanquan Chen, Dewen Qiu, y Shichang Xu. «TaNAC1 acts as a negative regulator of stripe rust resistance in wheat, enhances susceptibility to *Pseudomonas syringae*, and promotes lateral root development in transgenic *Arabidopsis thaliana*». *Frontiers in Plant Science* 6 (2015): 108. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00108>.

Wang, Hongyang, Yajuan Ren, Jing Zhou, Juan Du, Juan Hou, Rui Jiang, Haixia Wang, Zhendong Tian, and Conghua Xie. 'The Cell Death Triggered by the Nuclear Localized RxLR Effector PITG_22798 from *Phytophthora infestans* Is Suppressed by the Effector AVR3b'. *International Journal of Molecular Sciences* 18, no. 2 (2017): 409. <https://doi.org/10.3390/ijms18020409>.

Wang, Shumei, Hazel McLellan, Tatyana Bukharova, Qin He, Fraser Murphy, Jiayang Shi, Shaohui Sun, et al. «*Phytophthora infestans* RXLR effectors act in concert at diverse subcellular locations to enhance host colonization». *Journal of Experimental Botany* 70, n.º 1 (2019): 343-56. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery360>

Wang, W., Fangchan J. «Effectors of *Phytophthora* Pathogens Are Powerful Weapons for Manipulating Host Immunity». *Planta* 250, n.º 2 (2019): 413-25. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03219-x>.

Wang, Jing, Xiaoyu Long, Mawsheng Chern, y Xuwei Chen. «Understanding the Molecular Mechanisms of Trade-Offs between Plant Growth and Immunity». *Science China Life Sciences* 64, n.º 2 (2020): 234-41. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1719-y>.

Wang, Weizhen, y Youhua Long. «A Review of Biocontrol Agents in Controlling Late Blight of Potatoes and Tomatoes Caused by *Phytophthora infestans* and the Underlying Mechanisms». *Pest Management Science* 79, n.º 12 (2023): 4715-25. <https://doi.org/10.1002/ps.7706>.

Wharton, Phillip, Sandesh Dangi, Most M. Begum, David Douches, y Karen E. Hokanson. «Genotypic characterization of *Phytophthora infestans* populations in Bangladesh». *Plant Pathology* 72, n.º 6 (2023): 1136-48. <https://doi.org/10.1111/ppa.13725>.

Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, S. R., McDonald, N., Wiley, K., Bader, K. C., Gläßer, C., Mukhtar, M. S., Haigis, S., Ghamsari, L., Stephens, A. E., Ecker, J. R., Vidal, M., Jones, J. D. G., Mayer, K. F. X., Ver Loren Van Themaat, E., ... Braun, P..

«Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life». *Cell Host and Microbe*, (2014) 16(3), 364–375.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.004>

Wiesner-Hanks, Tyr, and Rebecca Nelson. 'Multiple Disease Resistance in Plants'. *Annual Review of Phytopathology* 54, no. Volume 54, 2016 (2016): 229–52.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100037>.

Whisson, Stephen C, Petra C Boevink, Shumei Wang, y Paul RJ Birch. «The cell biology of late blight disease». *Current Opinion in Microbiology* 34 (2016): 127-35.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.09.002>.

Witek, Kamil, Xiao Lin, Hari S Karki, Florian Jupe, Agnieszka I Witek, Burkhard Steuernagel, Remco Stam, et al. «A complex resistance locus in *Solanum americanum* recognizes a conserved *Phytophthora* effector». *Nature plants* 7, n.º 2 (2021): 198-208.
<https://doi.org/10.1038/s41477-021-00854-9>.

Wu, Chih-Hang, Ahmed Abd-El-Haliem, Tolga O. Bozkurt, Khaoula Belhaj, Ryohei Terauchi, Jack H. Vossen, and Sophien Kamoun. 'NLR Network Mediates Immunity to Diverse Plant Pathogens'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, no. 30 (2017): 8113–18.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1702041114>.

Yang, Li-Na, Hao Liu, Guo-Hua Duan, Yan-Mei Huang, Shiting Liu, Zhi-Guo Fang, E-Jiao Wu, Liping Shang, y Jiasui Zhan. «The *Phytophthora infestans* AVR2 Effector Escapes R2 Recognition Through Effector Disordering». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 33, n.º 7 (2020): 921-31. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-19-0179-R>.

Yoshida, Kentaro, Verena J Schuenemann, Liliana M Cano, Marina Pais, Bagdevi Mishra, Rahul Sharma, Chirsta Lanz, et al. «The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine». Editado por David Baulcombe. *eLife* 2 (2013): e00731.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00731>.

Yu, Xiao-Qian, Hao-Qiang Niu, Chao Liu, Hou-Ling Wang, Weilun Yin, y Xinli Xia. «PTI-ETI Synergistic Signal Mechanisms in Plant Immunity». *Plant Biotechnology Journal* (2024).
<https://doi.org/10.1111/pbi.14332>.

Yuen, J. E., y B. Andersson. «What Is the Evidence for Sexual Reproduction of *Phytophthora Infestans* in Europe?» *Plant Pathology* 62, n.º 3 (2013): 485-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02685.x>.

Zhang, Fan, Han Chen, Xinjie Zhang, Chuyun Gao, Jie Huang, Li Lü, Danyu Shen, et al. «Genome Analysis of Two Newly Emerged Potato Late Blight Isolates Sheds Light on Pathogen Adaptation and Provides Tools for Disease Management». *Phytopathology*® 111, n.º 1 (2021): 96-107. <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-20-0208-FI>