

Producto 22. Mapa poblacional de *P. infestans* en países miembros.
(Actividad 4.5. Elaboración de un mapa poblacional de *P. infestans*)

Florescia Lucca

2023



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina



FONTAGRO



Copyright, licencias CC y Disclaimer.

Códigos JEL: Q16

ISBN:

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Todos los derechos reservados; este documento puede reproducirse libremente para fines no comerciales.

FONTAGRO es un fondo administrado por el Banco pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Se prohíbe el uso comercial no autorizado de los documentos del Banco, y tal podría castigarse de conformidad con las políticas del Banco y/o las legislaciones aplicables. Las opiniones expresadas en esta publicación son exclusivamente de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, de su Directorio Ejecutivo ni de los países que representa.

El presente documento ha sido preparado por Florencia Lucca, Ivette Acuña, Cristina Tello y Rodrigo Morales

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract.....	4
Resumen	5
Introducción.....	6
Objetivos.....	8
Metodología.....	9
Resultados.....	19
Discusión	28
Conclusiones	31
Referencias Bibliográficas.....	33



Abstract

Late blight (LB) caused by *Phytophthora infestans* (Pi) (Mont.) de Bary is the most devastating disease of the potato crop worldwide. The center of origin of potato and Pi is Latin America, where the pathogen co-evolved with a great diversity of Solanaceae species. LB causes heavy annual losses due to crop losses and the costs of control measures. Fungicide applications are the main strategy for LB control. Genetic changes in Pi populations worldwide and particularly in Latin America may reduce the effectiveness of disease management practices. The genetic diversity of Pi has been monitored using a range of genetic markers, of which Single Sequence Repeats (SSRs) have been shown to be effective in defining multilocus genotypes. In particular, within the framework of the Fontagro Project, we set out to describe the genetic variation within and among populations of Pi from Argentina, Chile, Ecuador and Panama by a multiplex PCR reaction with 12 SSRs, analyzing them jointly with samples from Uruguay, Costa Rica and Brazil. A total of 528 samples with symptoms of LB were collected in this study. A total of 160 samples came from Ecuador, 106 from the highlands of Panama, 99 from Chile and 163 from Argentina from the main potato producing areas. Of the samples collected, 241 have been genetically characterized. The results revealed that recent Pi populations from Argentina, Chile, Brazil and Uruguay would be dominated by the EU_2_A1 clonal lineage, associated with the A1 mating type, and subclonal variations within this lineage can be distinguished according to the country of origin. Pi isolates from Ecuador were identified as belonging to the EC-1 clonal lineage, showing a high variability in the subpopulation included in this study. Two genotypic profiles were described in Panama, one of them, which we call "other", has not yet been reported in other potato producing regions of the world and the characterization of its genotypic profile is under analysis. The availability of information on Pi populations and an understanding of their population dynamics would allow us to advance in complementary studies, such as fungicide sensitivity studies, which would assist growers in the selection of the most appropriate fungicide for LB control.

Key words:

Argentina, Chile, Ecuador, late blight, Latin America, microsatellites, SSR, potato, population genetics, Panama.

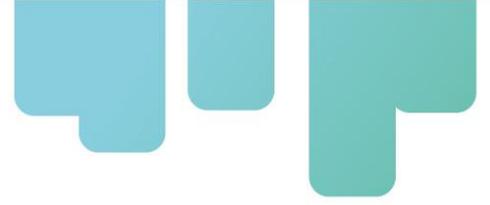


Resumen

El tizón tardío (TT) causado por *Phytophthora infestans* (Pi) (Mont.) de Bary es la enfermedad más devastadora del cultivo de papa a nivel mundial. El centro de origen de la papa y de Pi es América Latina, donde el patógeno co-evolucionó con una gran diversidad de especies de Solanáceas. El TT causa cuantiosas pérdidas anuales por mermas en el cultivo y los costos de las medidas de control. Las aplicaciones de fungicidas es la principal estrategia para el control del TT. Los cambios genéticos en poblaciones de Pi a nivel mundial y en particular en América Latina pueden reducir la efectividad de las prácticas de manejo de enfermedades. La diversidad genética de Pi se ha monitoreado utilizando una gama de marcadores genéticos, de los cuales las repeticiones de secuencia simple o SSR (por sus siglas en inglés *Single Sequence Repeats*) han demostrado su eficacia para definir genotipos multilocus. En particular en el marco del Proyecto Fontagro nos propusimos describir la variación genética dentro y entre poblaciones de Pi de Argentina, Chile, Ecuador y Panamá mediante una reacción de PCR multiplexada con 12 SSR, analizándola conjuntamente con muestras de Uruguay, Costa Rica y Brasil. Se colectaron en este estudio 528 muestras con síntomas de TT. Un total de 160 muestras provinieron de Ecuador, 106 de las tierras altas de Panamá, 99 de Chile y 163 de Argentina de las principales zonas productoras de papa. De las muestras colectadas, se han caracterizado genéticamente 241. Los resultados revelaron que las poblaciones recientes de Pi de Argentina, Chile, Brasil y Uruguay estarían dominadas por el linaje clonal EU_2_A1, asociadas con el tipo de apareamiento A1, pudiendo distinguirse variaciones subclonales dentro de este linaje según el país de origen. Los aislamientos de Pi de Ecuador fueron identificados como pertenecientes a la línea clonal EC-1, mostrando una alta variabilidad en la subpoblación incluida en este estudio. Dos perfiles genotípicos fueron descritos en Panamá, uno de ellos que denominamos “other” aún no se ha reportado en otras regiones productoras de papa del mundo y la caracterización de su perfil genotípico está en análisis. Contar con información de las poblaciones de Pi y comprender su dinámica poblacional, nos permitiría avanzar en estudios complementarios como, por ejemplo, de sensibilidad a fungicidas, que permitan asistir al productor en la selección del fungicida más adecuado para el control del TT.

Palabras Clave:

Argentina, Chile, Ecuador, genética poblacional, Latinoamérica, microsatélites, papa, SSR, tizón tardío, Panamá.



Introducción

El tizón tardío es la enfermedad más destructiva de la papa en todo el mundo. Es causada por el oomicete *Phytophthora infestans*, descrito por primera vez por Anton de Bary (de Bary, 1876; Brasier, 2009; Kroon *et al.*, 2012). *P. infestans* fue el patógeno que contribuyó a la Gran Hambruna de Irlanda en la década de 1840 (Bourke, 1993).

La papa (*Solanum tuberosum*) se originó y fue domesticada por primera vez en las montañas de los Andes de América del Sur, co-evolucionando con *P. infestans* y con una gran diversidad de especies de Solanáceas.

A pesar del intenso esfuerzo para controlar la enfermedad, este patógeno sigue siendo una gran amenaza para la producción de cultivos. Fry y colaboradores en una revisión hecha sobre *P. infestans* en 2015 lo consideran un patógeno re-emergente.

El tizón tardío de la papa causa cuantiosas pérdidas al año que incluyen tanto las pérdidas del cultivo, así como el costo en las medidas de control del tizón tardío. Las pérdidas globales se han estimado en € 9,4 mil millones por año considerando en conjunto a los países en desarrollo y desarrollados (Haverkort *et al.*, 2016).

En la década del 90 esta enfermedad causó epifitias en numerosos sistemas productivos, debido principalmente a migraciones y cambios en las características de las poblaciones del patógeno en diferentes territorios e incluso entre continentes (Andrison *et al.*, 2011; Fry *et al.*, 2015; Fry, 2016).

Dado lo anterior, diferentes grupos de investigadores alrededor del mundo se han enfocado en realizar estudios del patógeno, su epidemiología y ecología, el mejoramiento genético del cultivo y su manejo integrado para mejorar el control de la enfermedad. Se han formado redes de colaboración para promover la cooperación regional en torno a la enfermedad. Ejemplos de estas iniciativas se ven reflejados en Europa (EuroBlight), Estados Unidos (USABlight). América Latina (Tizón Latino) y Asia (AsiaBlight).

Las estrategias regionales y locales dependen en gran medida de las aplicaciones de fungicidas para control al tizón tardío.



Los cambios genéticos en poblaciones de *P. infestans* a nivel mundial y en particular en América Latina, pueden reducir la efectividad de las prácticas de manejo de enfermedades.

La diversidad genética de *P. infestans* se ha monitoreado utilizando una gama de marcadores genéticos (Cooke y Lees, 2004), de los cuales las repeticiones de secuencia simple o SSR (por sus siglas en inglés *Single Sequence Repeats*) o microsatélites han demostrado su eficacia recientemente para definir genotipos multilocus o MLGs (por sus siglas en inglés *Multilocus genotypes*) (Lees *et al.*, 2006). Donde un genotipo multilocus es la combinación de alelos que se encuentran en dos o más loci en un solo individuo. Los marcadores moleculares brindan la oportunidad de rastrear genotipos individuales y estudiar la diversidad de la población. Los microsatélites son marcadores codominantes que se han utilizado previamente para investigar la estructura genética y biología reproductiva de numerosos patógenos vegetales (Cooke y Lees, 2004). Hay rasgos adaptativos clave que contribuyen en el éxito de genotipos específicos *P. infestans*, como la capacidad de los esporangios o zoosporas para infectar y colonizar el tejido del huésped (agresividad), una diseminación eficiente, la supervivencia de una estación a otra, entre otras.

En los últimos años, en la Red Latinoamericana de tizón denominada TizonLatino (<https://tizonlatino.github.io/>), estamos utilizando una herramienta estandarizada basada en doce marcadores SSR para realizar estudios de genotipado, que nos proporcionen información útil sobre los niveles de diversidad genética y la estructura poblacional de *P. infestans* (Lucca *et al.*, 2019)

El objetivo de esta investigación fue monitorear la diversidad genética del patógeno presente en la actualidad en las principales regiones productoras de papa de Argentina, Chile, Ecuador y Panamá, analizando esta información conjuntamente con la de otras regiones productoras de papa de Latinoamérica, que nos permita inferir las posibles rutas de migración en esta región.



Objetivos

En particular en el marco del Proyecto Fontagro nos propusimos describir la variación genética dentro y entre poblaciones de *P. infestans* de Argentina, Chile, Ecuador y Panamá, analizando esta información conjuntamente con la de otras regiones productoras de papa de Latinoamérica como Uruguay, Costa Rica y Brasil. Para cumplir ese objetivo implementamos un monitoreo y toma de muestras del agente causal en el terreno mediante visitas a terreno y toma de muestras *in vivo* e impresión de tejido sobre tarjetas de papel celulosa clásica con tecnología FTA (Whatman WB120205). Finalmente, con la información obtenida del monitoreo y la caracterización genotípica nos propusimos elaborar un mapa de la situación poblacional de *P. infestans*.

Adicionalmente buscamos inferir a partir de los resultados de América Latina y los datos globales de SSR, las posibles rutas de migración en esta región.



Metodología

1. Aislamientos de *P. infestans*

En el presente estudio se emplearon aislamientos colectados mediante tarjetas de muestreo FTA, en Argentina, Ecuador y Panamá y desde Chile recibimos DNA extraído de muestras colectadas a campo, seguida de cámara húmeda y aislamiento en medio de cultivo.

Para los estudios poblacionales de Argentina se incluyeron 163 aislamientos colectados entre las campañas 2018-19 y 2020-21. Por su parte Panamá envió 49 aislamientos (2018-19) y tiene otro envío pendiente de 57 muestras colectadas en 2022. Ecuador colectó 160 aislamientos entre las campañas 2018 y 2023. Todas las muestras del agente causal de los mencionados países fueron colectadas con tarjetas FTA siguiendo la metodología propuesta (producto 18). Por su parte Chile envió 99 muestras de ADN genómico (en papel del filtro) de muestras colectadas entre 2019-20 y 2022-23. Para los estudios poblacionales se incluyeron también: un aislamiento colectado en Panamá en 2016, en la zona de producción de papa de Cerro Punta para determinar cambios en la población desde esa fecha a la actualidad, 16 aislamientos de Uruguay (2020), 9 de Costa Rica y 146 de Brasil. De Argentina y Chile, existe información de estudios genómicos previos que se incluirán en los análisis poblacionales como referencia para evaluar posibles cambios en la población. Respecto de Ecuador, se utilizará información publicada como referencia de las líneas clonales reportadas en ese país para los análisis poblacionales. De Panamá no se contaba al inicio de esta investigación estudios de caracterización genotípica previos, siendo este el primer reporte de las poblaciones del patógeno en ese país.

Se confeccionó una base de datos con todas las muestras colectadas con la siguiente información: Muestra, País, Identificación de la muestra (dos letras para referir al país según código ISO 3166-1 alpha2, dos dígitos para referir al año de muestreo y tres dígitos para identificar a cada muestra, ejemplo: AR20001), Código de muestra (asignado internamente por cada país), Año de muestreo, Fecha de muestreo, Provincia, Cantón/Comuna (cuando corresponda), Localidad, Latitud, Longitud, Altitud (msnm), Fuente, Tipo de variedad de papa, Variedad de papa y Muestreador.



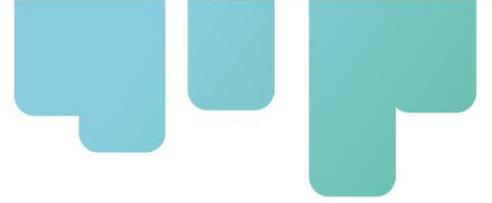
1.2 Mapa de aislamientos de *P. infestans* colectados

Con los datos georeferenciados de cada muestra (latitud y longitud) y la identificación de cada muestra se confeccionó un mapa donde se discriminó por color a cada uno de los países miembros de este estudio donde se detalla la información actualizada al mes de abril de 2023 de las muestras colectadas en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina en el marco del Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG de Alertas tempranas de Tizón, distinguiendo cada país por color. Se confeccionará un mapa mediante la Plataforma Google Maps (<https://www.google.com/maps/>) y adicionalmente se creará otro de similares características con la plataforma Datawrapper, desarrollada por Datawrapper GmbH (<https://www.datawrapper.de/>).

2 - Purificación del ADN genómico para estudios de genotipificación

El mismo día en el que se realizó la genotipificación de los aislamientos de *P. infestans*, se tomaron discos de 2mm de diámetro de cada tarjeta de muestreo FTA, obtenidos con un sacabocado específico (modelo *Harris micro-punch* o similar, Cat. No. WB100007, Whatman® Internacional Ltd., Reino Unido). Cada disco depositado en un microtubo de 0.2ml, contenía el ADN del patógeno. Entre muestras, el sacabocado fue lavado con etanol para evitar contaminaciones. El ADN genómico contenido en la matriz de estos discos, fue purificado siguiendo las indicaciones del fabricante (Flinders Technology Associates, Whatman® Internacional Ltd. Reino Unido) detalladas a continuación:

- 1) Agregar 150 µl de reactivo de purificación Whatman FTA (Cat. No. WHAWB120204) en el microtubo de 0,2 ml que contiene el disco de la tarjeta FTA.
- 2) Mezclar las muestras con el reactivo de purificación mediante una agitación suave durante 5 minutos.
- 3) Retirar el líquido con pipeta y descartarlo.
- 4) Repetir los pasos 1 a 3 una vez más.
- 5) Agregar 150 µl de una solución tampón o *buffer* TE -1 (10mM Tris, 0.1mM EDTA).
- 6) Dejar actuar 5 minutos.



7) Retirar el líquido con pipeta y descartarlo.

8) Repetir los pasos 5 a 7 una vez más.

9) Remover todo líquido remanente con el uso de una micropipeta. Dejar secar el disco con la tapa del tubo abierta durante 1 hora o a 37 °C durante 20-30 min. Asegurarse que los discos estén completamente secos. Esta etapa es crítica para una eficiente amplificación posterior.

10) El disco purificado es el templado en la reacción de amplificación por PCR multiplexada. Realizar la reacción multiplexada el mismo día en que se purifican los discos.

3 - Genotipificación de aislamientos de *Phytophthora infestans*

3.1 - Reacción de PCR multiplexada

Para identificar polimorfismos en la población de *P. infestans* recolectada en plantas de papa, se evaluaron marcadores polimórficos de microsatélites. El protocolo consistió en una reacción de PCR multiplexada con 12 pares de cebadores en sentido y antisentido (*forward* y *reverse*) siguiendo la metodología propuesta por Li y colaboradores (2013). Esta variante de la reacción de PCR tradicional (PCR punto final) permite que 12 loci se amplifiquen simultáneamente en la misma reacción. Uno de los cebadores de cada par se marcó con uno de los siguientes fluoróforos: FAM, VIC, NED o PET, permitiendo maximizar la capacidad de esta reacción múltiple, discriminando los diferentes loci y alelos por tamaño y color. Los cebadores de microsatélites seleccionados, su secuencia, el fluoróforo utilizado y el rango de tamaño del producto de amplificación esperado (expresado en pares de bases, pb) se muestran en la Tabla 1.

Previo a la reacción, se realizaron dos mezclas de oligonucleótidos, una de ellas contenía 10 pares de cebadores y la otra los 2 pares restantes. Las reacciones de PCR en multiplex son complejas, por lo que hay 2 *primers* que son agregados en forma separada, porque no pudieron ser incluidos con éxito a la mezcla de los otros 10 cebadores. Las reacciones se prepararon en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, con un tratamiento de protección de la luz (LightSafe, Cat no. Z688312, Sigma) o eventualmente fueron protegidos de la luz con papel de aluminio. Dada la sensibilidad de los reactivos marcados con fluoróforos, se procuró no exponer las soluciones de cebadores marcados (tanto los stocks como las alícuotas de trabajo) a la luz durante largos períodos de



tiempo, para evitar que su eficiencia en la reacción se vea disminuida. Cada solución madre (*stock*) de los cebadores estaba formulada a una concentración de 100 μM . Las soluciones de trabajo estaban formuladas a una concentración de 10 mM. Las cantidades utilizadas de cada cebador en cada reacción de amplificación, se resumen en la Tabla 2, siguiendo el protocolo de Li *et al.* (2013) sugerido por la Red Euroblight.

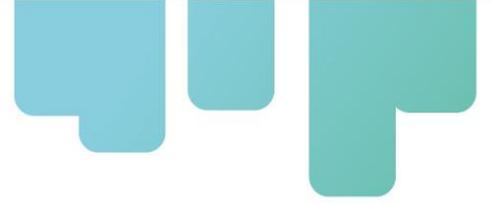


Tabla 1: Secuencias específicas de los cebadores empleados en la reacción de PCR multiplexada y sus características.

Locus SSR	Secuencia de cebadores	Fluoróforo	Rango esperado de tamaño del producto (pb)*
PiG11	Fwd-NED-TGCTATTTATCAAGCGTGGG Rev-GTTTCAATCTGCAGCCGTAAGA	NED	130–180
Pi02/PinfSSR3	Fwd-NED-ACTTGCAGAACTACCGCCC Rev-GTTTGACCACTTTCCTCGGTTT	NED	255–275
PinfSSR11	Fwd-NED-TTAAGCCACGACATGAGCTG Rev-GTTTAGACAATTGTTTTGTGGTCGC	NED	325–360
D13	Fwd-FAM-TGCCCCCTGCTCACTC Rev-GCTCGAATTCATTTTACAGACTTG	FAM	100–185
PinfSSR8	Fwd-FAM-AATCTGATCGCAACTGAGGG Rev-GTTTACAAGATACACACGTCGCTCC	FAM	250–275
PinfSSR4	Fwd-FAM-TCTTGTTCGAGTATGCGACG Rev-GTTTCACTTCGGGAGAAAGGCTTC	FAM	280–305
Pi04	Fwd-VIC-AGCGGCTTACCGATGG Rev-GTTTCAGCGGCTGTTTCGAC	VIC	160–175
Pi70	Fwd-VIC-ATGAAAATACGTCAATGCTCG Rev-CGTTGGATATTTCTATTTCTTCG	VIC	185–205
PinfSSR6	Fwd-GTTTTGGTGGGGCTGAAGTTTT Rev-VIC-TCGCCACAAGATTTATTCCG	VIC	230–250
Pi63	Fwd-VIC-ATGACGAAGATGAAAGTGAGG Rev-CGTATTTTCCTGTTTATCTAACACC	VIC	265–280
PinfSSR2	Fwd-PET-CGACTTCTACATCAACCGGC Rev-GTTTGCTTGACTGCGTCTTTAGC	PET	165–180
Pi4B	Fwd-PET-AAAATAAAGCCTTTGGTTCA Rev-GCAAGCGAGGTTTGTAGATT	PET	200–295

*pb = pares de bases



Tabla 2. Mezcla de cebadores para la reacción de PCR multiplexada.

	SSR	Volúmenes por reacción (µl)*	
		Forward	Reverse
Mezcla I	G11	0,12	0,12
	SSR3	0,12	0,12
	SSR11	0,12	0,12
	D13	0,16	0,16
	SSR4	0,08	0,08
	Pi04	0,12	0,12
	Pi70	0,12	0,12
	SSR6	0,07	0,07
	Pi63	0,12	0,12
	SSR2	0,2	0,2
	Mezcla II	SSR8	0,24
Pi4B		0,24	0,24

*La concentración de las soluciones de trabajo fue ajustada a 10 mM.

Para la reacción de PCR se utilizó el kit de PCR de microsatélites Type-it (*Type-it Microsatellite PCR Kit*, Valencia, CA, EE.UU, Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Reactivos	Volumen por reacción (µl)
2X type IT Multiplex	6,25
Mezcla I	2,46
Mezcla II	0,96
H ₂ O	2,83
Volumen final de la reacción	12,5

Se confeccionó una plantilla con las cantidades exactas de cada reactivo necesario para 1 reacción y su extrapolación al número final de muestras analizadas. En cada ensayo se amplificaron como mínimo 8 muestras (considerando los volúmenes mínimos de cada reactivo que puedan ser pipeteados) y se incluyó en el cálculo de los volúmenes finales un 10% adicional para absorber los



errores debidos al pipeteo.

Se dispensaron 12,5 μ l de la mezcla de reacción en cada tubo de reacción de 0.2ml que contenía el disco de 2mm de la tarjeta FTA purificada. Se agitó la mezcla con ayuda de un vórtex (Vortex-2 Genie Modelo G560E, Scientific Industries. INC. EEUU) y seguidamente se le aplicó una centrifugación corta, previo al inicio del termociclado.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem, N.Y., U.S.A) e incluyó un primer paso de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de amplificación, que incluían una desnaturalización del ADN a 95°C (30 segundos), un paso de apareamiento de los cebadores flanqueantes a sus secuencias complementarias (*annealing*) a 58°C (90 segundos) y una elongación de los fragmentos a 72°C (30 segundos). El programa culminó con una elongación final a 72°C durante 30 minutos que permite disminuir la cantidad y número de amplificaciones espúreas debido al desplazamiento de la ADN polimerasa en las regiones repetitivas (*stutters* en inglés).

3.2 - Electroforesis capilar de la muestra

Los aislamientos amplificados en el punto 3.1 fueron sometidos a una electroforesis capilar en un secuenciador automático GA 3500XL (Applied Biosystem, N.Y. U.S.A) mediante una electroforesis capilar calibrado para detectar los cuatro fluoróforos FAM, NED, PET y VIC (Applied Biosystem, N.Y. U.S.A) y un patrón de tamaño GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystem, N.Y. U.S.A). Este estándar de tamaño está diseñado para dimensionar fragmentos de ADN en el rango de 35-500 nucleótidos y proporciona 16 fragmentos marcados de cadena sencilla.

Previo a la corrida electroforética, las muestras debieron ser tratadas con una mezcla de formamida HiDi / LIZ. Se agregaron 6 μ l del patrón de tamaño 500 LIZ® a 1 ml de formamida HiDi previamente alicuotada. Se dispensaron 10,2 μ l de la mezcla HiDi / LIZ en los pocillos de una placa de PCR nueva (modelo AB0600, Abgene). Se añadieron seguidamente 2 μ l de producto de PCR. Generalmente se realizaron diluciones del producto de PCR que oscilaron entre 1:10 a 1:50. Se selló la placa y se inició la electroforesis capilar. Esta metodología fue llevada a cabo en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del CICVyA, INTA Castelar, según protocolos

operativos estandarizados bajo sistema de gestión de la calidad ISO 17025 y especificaciones del fabricante (Fig 1).



Figura 1. Genotipificación de *P. infestans* llevada a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce y en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del CICVyA, INTA Castelar (Consortio Argentino de Tecnología Genómica)

3.3. - Análisis de perfiles de genotipificación de aislamientos de *P. infestans*.

Como producto de la corrida electroforética se obtuvo por cada muestra (aislamiento) un archivo de extensión “.fsa”. El mismo fue analizado por un programa específico (GeneMapper v4.1 o versión superior, Applied Biosystem, N.Y., U.S.A) para la asignación de alelos que se encontraba anexo al secuenciador.

Se confeccionó una tabla de alelos siguiendo el consenso de asignación de picos de la red Euroblight (Li *et al.*, 2013), a fin de poder comparar los perfiles de amplificación de genotipos provenientes de distintas regiones productoras de papa (nacionales e internacionales).

3.4 - Mapa genotípico de *P. infestans*

Con los datos georeferenciados de cada muestra (latitud y longitud), la identificación de cada muestra y el genotipo asignado a partir del análisis de los perfiles de SSR (punto 3.3) se



confeccionó un mapa donde se discriminó por color a los genotipos encontrados en los países miembros de este estudio. Se detalla la distribución de los genotipos de *P. infestans* caracterizados a partir de muestras colectadas en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina, distinguiendo cada genotipo por color. Se confeccionará un mapa mediante la Plataforma Google Maps (<https://www.google.com/maps/>) y adicionalmente se creará otro de similares características con la plataforma Datawrapper, desarrollada por Datawrapper GmbH (<https://www.datawrapper.de/>).

3.5 - Diversidad clonal y riqueza alélica

Para analizar la similitud genética entre los aislamientos se emplearon técnicas de análisis multivariado, utilizando el paquete estadístico Poppr (Kamvar *et al.*, 2014).

Para observar el nivel de ploidía de los aislamientos en estudio, se utilizó la función "*ploidy*" del paquete estadístico Poppr.

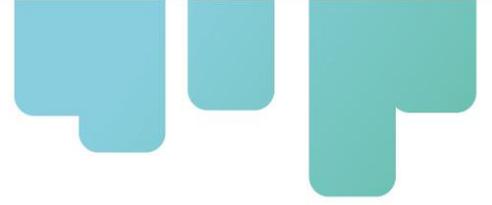
Se obtuvo una matriz de distancia genética de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004). Esta distancia genética emplea un modelo de mutación gradual, que usa el motivo de repetición para comparar dos alelos en un solo locus y determina el número de mutaciones como una medida cuantitativa de la distancia genética.

Para estimar la diversidad de genotipos en las poblaciones se calcularon diferentes índices. **H**: índice de diversidad de MLG de Shannon-Wiener, explica tanto la abundancia como la uniformidad de los genotipos presentes en una población (Shannon, 2001). **G**: índice de diversidad MLG de Stoddart y Taylor, también conocido como el índice inverso de Simpson, tiene como valor mínimo 1 (población con solo 1 genotipo), y el valor máximo es el número de genotipos de la población (riqueza de especies o haplotipos). Es decir, cuanto mayor sea el valor, mayor será la diversidad (Stoddart y Taylor, 1988). El índice de Simpson, **lambda** estima la probabilidad de que dos genotipos seleccionados al azar en una población sean diferentes (Simpson, 1949). **Hexp**: diversidad genética imparcial de Nei, explica las diferencias genéticas por locus dentro de las poblaciones (Nei, 1978). Para comparar la diversidad genotípica dentro de poblaciones de diferentes tamaños, se estimaron los mencionados índices siguiendo un muestreo



aleatorio de datos utilizando la función rarefacción con 1000 réplicas “*Jack-knife*” del paquete Poppr (Kamvar *et al.*, 2014).

Las relaciones genéticas entre los aislamientos se representaron gráficamente utilizando una red de expansión mínima o MSN (de inglés *Minimum Spanning Network*) utilizando la función *bruvo.msn* del paquete Poppr, con el fin de visualizar la relación entre los diferentes MLGs e identificar los MLGs más frecuentes entre las poblaciones.



Resultados

1. Aislamientos de *P. infestans*

Se colectaron en este estudio un total de 528 muestras con síntomas compatibles con el tizón tardío de la papa. Las muestras fueron tomadas de hojas. De material muestreado, 160 aislamientos provinieron de Ecuador, de las provincias de Chimborazo, Carchi, Cotopaxi, Bolívar, Azuay, Tungurahua y Pichincha. Por su parte otros 106 aislamientos se colectaron en las tierras altas de Panamá, en la zona de Cerro Punta. Por su parte los muestreos en Chile se realizaron en la Región de Los Lagos, donde 99 muestras se colectaron en las comunas de Dalcahue, Puqueldón, Osorno, Río Bueno, Queilén, Purranque, Fresia y Chaitén. Finalmente de Argentina 163 muestras fueron obtenidas en las principales zonas productoras de papa del país incluyendo las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Tucumán y San Luis. Se incluyen en el anexo la base de datos de los aislamientos colectados.

1.2 Mapa de aislamientos de *P. infestans* colectados

Se confeccionaron mapas de distribución de las muestras de *P. infestans* en base al detalle actualizado al mes de abril de 2023 de las colectas realizadas en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina en el marco del Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG de Alertas tempranas de Tizón. Se distinguen las muestras de cada país por color (Fig 2)



País
■ Argentina ■ Chile ■ Ecuador ■ Panamá



Map: Florencia Lucca • Source: Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG • Created with Datawrapper

Figura 2. Mapa de muestras colectadas de *P. infestans* en Latinoamérica.

Mapa con la distribución de las muestras colectadas de *P. infestans* en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina en el marco del Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG de Alertas tempranas de Tizón. Se distinguen las muestras de cada país por color



Este mapa puede ser descargado del siguiente link: <https://datawrapper.dwcdn.net/7HgZo/3/>
Asimismo, se creó un mapa en la Plataforma de Google Maps, al que se puede acceder mediante el siguiente link: <https://www.google.com/maps/d/u/0/edit?mid=1-JQIxQ6iiOzj24D-gKQNMnTpF012ag&usp=sharing>

2 - Purificación del ADN genómico para estudios de genotipificación

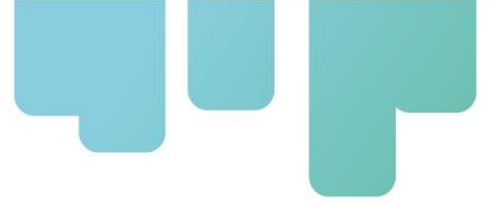
Del total de muestras recolectadas con tarjetas de prueba FTA, se lograron amplificar perfiles de SSR en forma exitosa en una reacción multiplexada con eficiencia en promedio del 76,25%. La efectividad varía entre el 65 y el 80%, según el año y país de origen. Analizando estos valores, la clave del muestreo está en la identificación correcta de las lesiones debidas al tizón, más que en un problema inherente al muestreo.

Las muestras con amplificación negativa se re amplificarán a fin de para incluirlas, de ser posible, en el estudio final.

A fin de mejorar la efectividad en el muestreo con tarjetas FTA, además de los Instructivos correspondientes: i) **Protocolo de muestreo utilizando tarjetas FTA** (version 1.2., enero 2021, autores: Guido M. Cabarrou y Florencia Lucca y ii) **Formulario de muestreo de *Phytophthora infestans* utilizando tarjetas FTA** (version 1.2, enero 2021, autores: Guido M. Cabarrou y Florencia Lucca), iii) video sobre muestreo con tarjetas FTA (<https://youtu.be/megn7uohtww>), se realizará un video de apoyo a productores y asesores locales o responsables de tomar las muestras en el campo, con imágenes diversas de la sintomatología del tizón tardío de hoja, tallo y tubérculo para minimizar los errores en la identificación de las lesiones en el monitoreo.

3 -Genotipificación de aislamientos de *Phytophthora infestans*

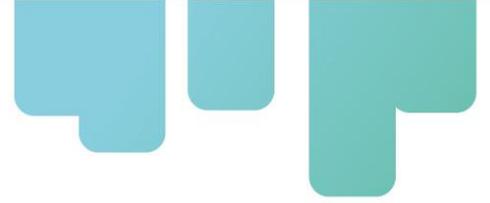
De las muestras colectadas, se han caracterizado genéticamente a la fecha 241 aislamientos de *P. infestans*. El poder de resolución de la metodología de genotipificación propuesta por Li et al. (2013) mediante una reacción multiplexada de 12 marcadores SSR demostró ser apropiado para el análisis de los aislamientos de *P. infestans* de Latinoamérica, tanto a partir de ADN genómico (muestras de Chile) así como de ADN mixto de huésped y patógeno contenido en las tarjetas FTA.



Las diluciones del producto de PCR empleadas en la electroforesis capilar con marcadores fluorescentes fueron ajustadas entre 1:10 y 1:50, similares a las sugeridas en la red Europea para amplificaciones a partir de tarjetas FTA (1:20). Los fragmentos marcados con los cuatro fluoróforos fueron resueltos por tamaño y color. La asignación de los alelos para cada uno de los marcadores SSR requirió entrenamiento a fin de evitar registrar picos no reales (o artefactos) de la amplificación. Para facilitar este trabajo, se reunieron los principales alelos encontrados en las poblaciones estudiadas a modo de catálogo de alelos para análisis posteriores. En el proceso de asignación de alelos, se registraron tres alelos en uno o más loci, lo que indica diferentes niveles de ploidía en los aislamientos. La diversidad genética del patógeno analizada con el paquete Poppr se realizó suponiendo que los aislamientos en estudio eran triploides.

Los alelos pudieron asignarse correctamente en las poblaciones estudiadas. No se observó la presencia de alelos fuera del rango de cobertura de tamaño esperado. En el caso particular de Panamá y Costa Rica, el patrón de amplificación obtenido nunca ha sido reportado en poblaciones de *P. infestans* del mundo, por lo que su genotipo aún está por definir, consignándolo en este trabajo como "other" (otros).

Para el estudio de diversidad genética de las poblaciones de *P. infestans* de los países miembros de la Plataforma de Tizón se incluyeron un conjunto de datos de perfiles de SSR de aislamientos del patógeno provenientes de Brasil (146), Uruguay (16) y Costa Rica (9). La población reportada para Argentina, Chile, Uruguay y Brasil por Forbes et al. en 1998 y por Adler et al. en 2002, ha cambiado en el presente. Los aislamientos más recientes de *P. infestans* de las regiones mencionadas fueron clasificados como pertenecientes a la línea clonal EU_2_A1, por comparación de perfiles con bases de datos de poblaciones mundiales publicadas (Li et al., 2013, Cooke, et al., 2012, Alor Romero, et al., 2019, Njoroge et al., 2019) y con los reportados en la EuroBlight Network (David Cooke, comunicación personal) Zanotta, 2019, Lucca et al. al., 2019. Los perfiles del genotipo EU_2_A1 de Argentina y Uruguay se agruparon más próximos (posiblemente debido a un flujo génico significativo entre ambos países) (Fig 3 y 4). En cuanto a Brasil si bien fue identificado como perteneciente a la línea clonal EU 2_A1, se agrupan más más



distanciados de las muestras de Chile, Argentina y Uruguay (Fig 3 y 4), identificándose variantes alelicas según el país de origen. Asimismo, el MSN muestra un aislado de Brasil muy próximo al grupo que forman los aislados de Argentina y Uruguay (como si procediera de una introducción reciente). El resto de los aislados de Brasil se posicionan más próximos a la rama EU_2_A1 de Chile, pudiéndose tratar de un caso de introducciones múltiples en Brasil.

El primer informe de este cambio en la población de *P. infestans* se detectó en Argentina (Lucca y Huarte, 2012), donde la población presente a finales de los 90, constituida por linajes clonales pertenecientes al apareamiento A2 (AR1 a AR5), fue desplazada por el EU2_A1, un genotipo reportado en Europa a principios de los 80 (Cooke et al., 2012). Posteriormente, cuando analizamos muestras de Chile y Brasil, los resultados mostraron que el linaje clonal dominante era también 2_A1, desplazando a los linajes clonales US-1 (Chile) y BR-1 (Brasil). Este antiguo linaje clonal europeo también se notificó recientemente en África (Njoroge et al. 2019).

Los aislamientos de *P. infestans* en cultivos de papa en Ecuador pertenecen al linaje clonal EC-1. La población está compuesta por un alto número de genotipos que exhiben una alta similitud entre sí.

Los aislamientos de *P. infestans* de Costa Rica y Panamá se agruparon muy próximos tanto en el MSN como en los diagramas de dispersión DAPC, compartiendo un perfil de SSR único definido en este trabajo como "other", coexistencia con otras líneas clonales en cada país. En Costa Rica se identificó además a la línea clonal US_8. En Panamá se observaron además aislamientos asociados al perfil EU_2A1 coexistiendo en campos de papa muy próximos. La frontera entre Panamá y Costa Rica está muy cerca de la zona productora de papa de Panamá (Cerro Punta). El movimiento de semilla (contrabando) o papa comercial ha sido intenso en esta frontera. Hay variedades comunes en ambos países (provenientes del Centro Internacional de la Papa, CIP) como es Floresta. Parte de la semilla de esta variedad producida en Costa Rica fue introducida a Panamá sin ningún análisis fitosanitario. Por otro lado, la variedad Granola, muy sembrada en Panamá, ha sido enviada a Costa Rica en condiciones similares. Asimismo, los productores de papa de Panamá suelen cruzar la frontera hacia Costa Rica para comprar insumos para la



producción de papa, lo que favorece el contrabando. Por lo tanto, no es sorprendente que se encuentren aislamientos de *P. infestans* con un perfil SRR similar (como "otros") en ambos países (Arnulfo Gutiérrez, comunicación personal).

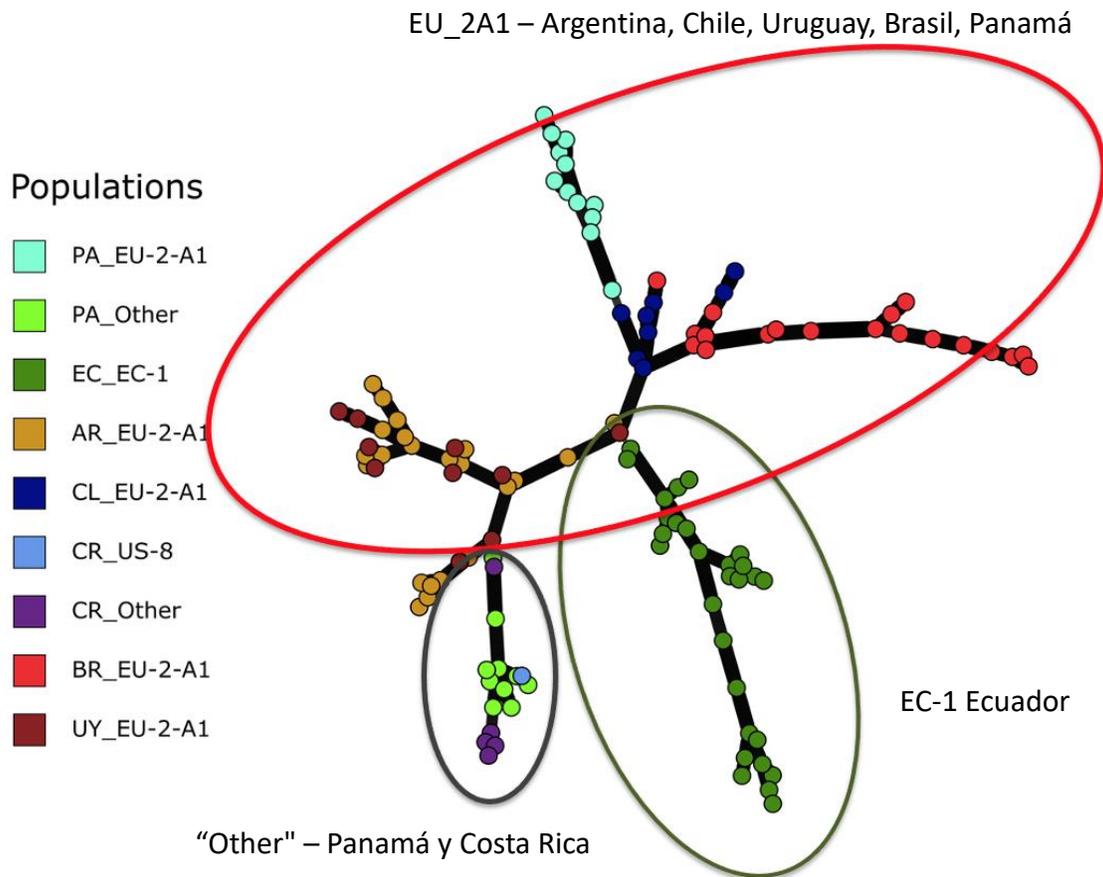


Figura 3. Poblaciones de *P. infestans* de Argentina, Chile, Ecuador, Panamá, Costa Rica y Uruguay. Redes de expansión mínima (*Minimum Spanning Network*, MSN) para aislamientos (*Samples*) de *P. infestans* agrupados de acuerdo con la sub-población (*Population*) analizada. Cada nodo (*Node*) representa una agrupación de individuos que presentan un mismo MLG.

Referencias. Las muestras de cada subpoblación están identificadas con un color: Argentina (marrón claro), Uruguay (marrón oscuro), Chile (azul), Ecuador (verde oscuro) y Panamá (verde claro: "other") y (turquesa: EU_2A1), Costa Rica (celeste: US8) y (violeta: "other"). El grosor de la red es proporcional a la distancia genética de Bruvo, mientras que la longitud es arbitraria. En la referencia de los tamaños de los nodos se incluye el número de individuos que contiene cada MLG.

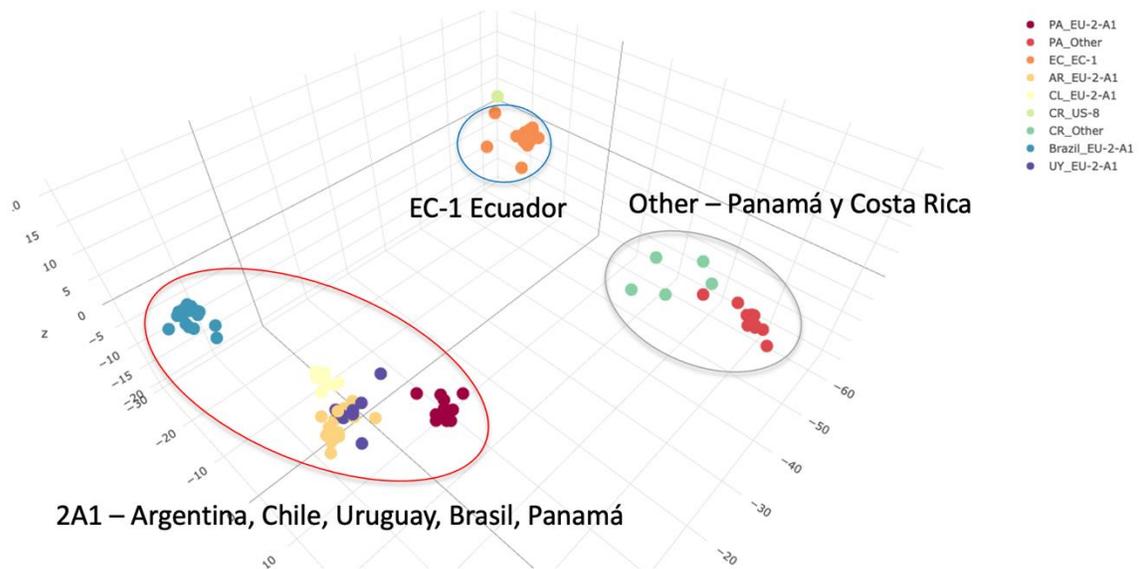


Figura 4. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) utilizando 12 loci microsatélites. Este diagrama de dispersión 3D muestra los dos primeros componentes principales del DAPC de los genotipos de *Phytophthora infestans* encontrados en Latinoamérica en este estudio. Los grupos se muestran con diferentes colores según el genotipo asignado.

3.4 - Mapa genotípico de *P. infestans*

Se confeccionaron mapas genotípicos de poblaciones de *P. infestans* en Latinoamérica en base al detalle actualizado al mes de abril de 2023 de las muestras genotificadas de Panamá, Ecuador, Chile y Argentina. Se distingue cada genotipo por color (Fig 5).

Genotipo

■ EC_1 ■ EU_2_A1 ■ Other



Map: Florencia Lucca • Source: Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG • Created with Datawrapper

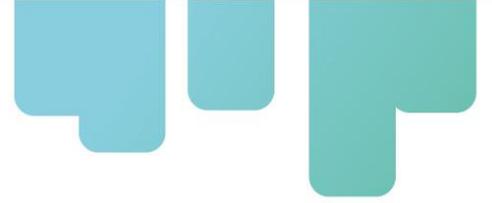
Figura 5. Mapa genotípico de *P. infestans* en Latinoamérica

Mapa de los genotipos amplificados en muestras de *P. infestans* colectadas en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina en el marco del Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG de Alertas tempranas de Tizón. Se distinguen los genotipos por color



Este mapa puede ser descargado del siguiente link: <https://datawrapper.dwcdn.net/3fFq1/3/>

Asimismo, se creó un mapa en la Plataforma de Google Maps, al que se puede acceder mediante el siguiente link: https://www.google.com/maps/d/u/0/edit?mid=1_OZbMr46J0Hiko0U6R-otgFAP-Es6Ls&usp=sharing



Discusión

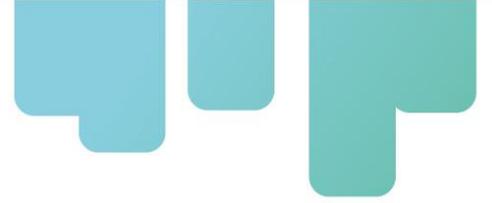
La necesidad de desarrollar estrategias que aprovechen al máximo opciones alternativas para una protección más sostenible de los cultivos y una mejor administración de los fungicidas es prioritaria. Para ser sostenibles y adoptadas, estas estrategias deben adaptarse a la variabilidad de las poblaciones de *P. infestans* y su rápida evolución, esto incluye un manejo integrado de la enfermedad, que supone que las poblaciones de patógenos sean monitoreadas tanto a nivel de genotipos como de fenotipos, incluidos la virulencia, agresividad y sensibilidad a los fungicidas, entre otras características. La inestabilidad genética de sus poblaciones es una de las razones por las que *P. infestans* es tan difícil de controlar. Tal adaptabilidad genética pone en peligro el desarrollo de cultivares resistentes duraderos y el manejo sustentable de fungicidas.

Los estudios genéticos utilizando marcadores de microsatélites (SSRs) han mostraron que las poblaciones de *P. infestans* en el mundo evolucionan rápidamente, pudiéndose trasladar de una región a otra (Li *et al.*, 2013; Fry, 2020; Acuña *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se pudieron genotipificar aislamientos de *P. infestans* mediante una reacción multiplexada de 12 marcadores moleculares microsatélites propuesta por la red EuroBlight, que se complementó al muestreo en campo con tarjetas FTA (con ADN genómico mixto de huésped y patógeno).

Estudios poblacionales globales de finales de los 90 realizados por Adler *et al.* (2002) y Forbes *et al.* (1998) describen en Chile la dominancia de la línea clonal US-1 (tipo de apareamiento A1), en Argentina se identificaron las líneas clonales AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5 (tipo de apareamiento A2) y en Brasil la población estaba dominada por la línea clonal BR-1 (tipo de apareamiento A2) (Reis *et al.*, 2005). Esta misma base de datos muestra en Ecuador la dominancia del linaje clonal EC-1 asociada al cultivo de papa. De Panamá no se tienen reportes de la caracterización molecular de las poblaciones de *P. infestans* hasta el momento.

En Argentina, los aislamientos de *P. infestans* colectados en este estudio fueron identificados como pertenecientes a la línea clonal EU_2_A1. El primer reporte del cambio poblacional de *P. infestans* en la región se detectó en Argentina en 2010 (Lucca y Huarte, 2012). Al igual que en



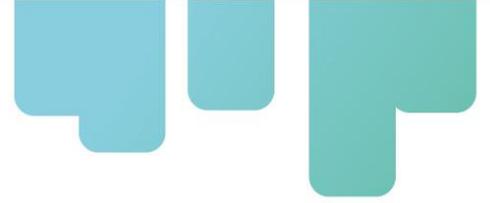
Argentina, los aislamientos de las poblaciones más recientes de *P. infestans* de Chile y Brasil y Uruguay incluidas en este estudio también fueron caracterizados en base a sus perfiles de SSR como pertenecientes al linaje clonal EU_2_A1.

La línea clonal EC-1 identificada en Ecuador coincide con reportes previos del patógeno asociado con la papa y la papa amarilla (Oyarzun et al. 1998). En este estudio se describe con la metodología de SSR una alta variación dentro de la línea clonal EC_1, siguiendo la tendencia reportada en Colombia para las poblaciones EC-1 allí descritas.

Como mencionáramos para Panamá, se caracterizaron por primera vez las poblaciones de *P. infestans* en la principal región productora del país ubicada en Cerro Punta y se está definiendo la asignación de los genotipos correspondientes a los perfiles encontrados.

Como se mencionara, en el sur de América Latina, el protagonismo lo toma la línea clonal EU_2A1, predominando en Argentina, Chile, Brasil y Uruguay. Esta línea clonal fue descrita en Europa a principios de los 80 (Cooke et al., 2012), presentándose en la actualidad en baja proporción en esa región según lo indica el sitio web de Euroblight a través del mapa de genotipos y del análisis de diversidad genética de la población de 2018 publicado en el reporte de resultados del seguimiento del tizón tardío de la papa (Potato blight tracking in Europe, 2019). La disminución de la proporción del linaje 2_A1 que actualmente se observa en Europa puede ser un signo de su desplazamiento por el linaje clonal 13_A2. (Alor Romero et al., 2019 Mariette et al., 2016). EU_2_A_1 se presenta como un evento migratorio (Fry et al., 1993).

Si bien la presencia de la línea clonal EU_2_A1 en Europa ha disminuido, ha empezado a identificarse en otras zonas alejadas de Europa en los últimos años. En coincidencia con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, cultivos de papa y tomate de Argelia (Rekad et al., 2017) y África (Njoroge et al., 2019) reportan su presencia, sin dudas, ayudado por la globalización en la comercialización de tubérculos de papa semilla. La aparente mayor aptitud de linaje EU_2_A1 hizo que este genotipo fuera capaz de desplazar a las poblaciones establecidas y mantenerse en el tiempo como sucedió en Argentina, Chile. En Chile el cambio poblacional pudo identificarse en la campañas 2006/7 (Acuña et al., 2019). En Argentina pudo ser detectado en aislamientos

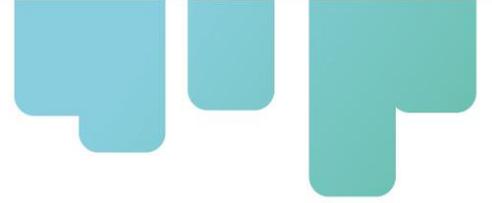


colectados a partir de 2007. Pero dado que no hubo muestreo del patógeno desde finales del 2000 hasta 2007 no es posible detectar con mayor precisión el momento en el que se dio ese cambio poblacional.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este reporte, el monitoreo continuo de las poblaciones de *P. infestans* (vigilancia epidemiológica) empleando las tarjetas FTA y la genotipificación posterior es crucial para identificar cambios en la población del patógeno. Contar con información actualizada de las mismas y comprender su dinámica poblacional, permitirá avanzar en estudios complementarios como, por ejemplo, de sensibilidad a fungicidas (Schepers et al., 2018), que permitan asistir al productor en la selección del fungicida más adecuado para el control del tizón tardío, acoplando la epidemiología a la toma de decisiones, en pos de un uso sostenible de productos fitosanitarios.

La dinámica de las poblaciones de *P. infestans* en Latinoamérica y en otras regiones productoras de papa muestra la necesidad de extremar las medidas de control sanitario para evitar la posible introducción de tubérculos de papa contaminados con nuevos linajes de *P. infestans*.

El estudio de las poblaciones de *P. infestans* en Latinoamérica en la Red Tizon Latino nos permitirá conocer cómo evoluciona el patógeno y así poder trabajar conjuntamente en estrategias más eficientes y sostenibles de mitigación de la enfermedad en la región.



Conclusiones

Este estudio es una contribución al esfuerzo mundial por caracterizar *P. infestans* y proporciona información genotípica sobre de las poblaciones de patógeno en regiones estratégicas de producción de papa del mundo como lo es Latinoamérica.

Los estudios genómicos con un panel de 12 marcadores SSR de aislamientos de *P. infestans* colectados con tarjetas FTA fueron exitosos. Las tarjetas FTA son una eficiente herramienta para investigar los cambios de la población de *P. infestans* en Latinoamérica a partir de ADN mixto del huésped y el patógeno para estudios genómicos posteriores.

Los resultados presentados en este trabajo revelaron que las poblaciones recientes de *P. infestans* de Argentina, Chile, Brasil y Uruguay estarían dominadas por el linaje clonal EU_2_A1, asociadas con el tipo de apareamiento A1, pudiendo distinguirse variaciones subclonales dentro de este linaje según el país de origen.

Los aislamientos de *P. infestans* de Ecuador fueron identificados como pertenecientes a la línea clonal EC-1, mostrando una alta variabilidad en la subpoblación incluida en este estudio.

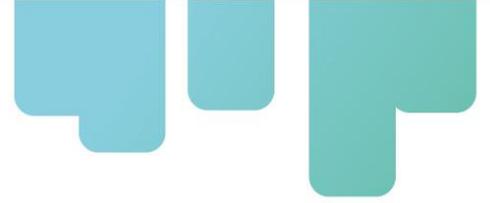
Dos perfiles genotípicos fueron descritos en Panamá, uno de ellos aún no reportado en otras regiones productoras de papa de Latinoamérica y del mundo y la caracterización de su perfil genotípico se encuentra en análisis. Aún nos resta incluir en estos estudios las muestras de Costa Rica e incluir en el análisis global información reportada en la bibliografía que nos permita inferir las rutas de migración de las poblaciones de *P. infestans* en la región.

Contar con información de las poblaciones del patógeno y comprender su dinámica poblacional, nos permitiría avanzar en estudios complementarios como, por ejemplo, de sensibilidad a fungicidas, que permitan asistir al productor en la selección del fungicida más adecuado para el control del tizón tardío. Este enfoque busca acoplar la epidemiología con el apoyo a la toma de decisiones.

Estudiar las poblaciones de manera conjunta y no aisladamente, permitirá conocer como es la evolución del patógeno y poder así trabajar mancomunadamente en estrategias de mitigación de la enfermedad más eficientes y sostenibles.

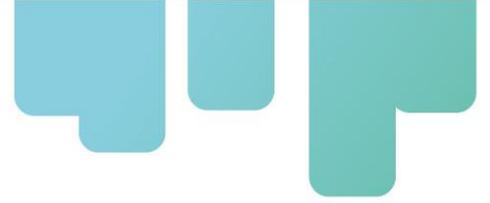


Este trabajo se ha volcado en una publicación científica que está siendo revisada y cuya versión borrador se adjunta a la presente.

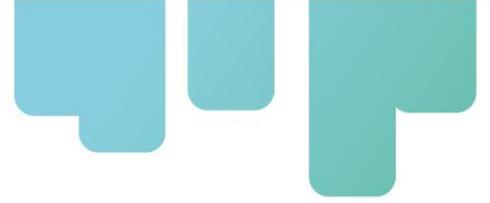


Referencias Bibliográficas

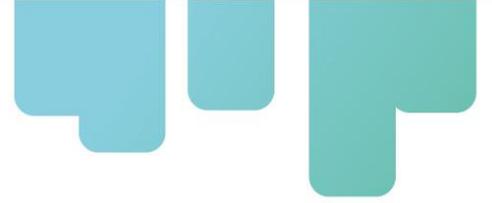
- Acuña, I.; Bravo, R.; Gutierrez, M. (2019). "Tizón tardío de la papa: Estrategia de manejo integrado con alertas temprana". *Boletín INIA* N° 399. Disponible en: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR41538.pdf>
- Adler, N., Chacon, G., Forbes, G., y Flier, W. (2002). "*Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host-specificity". In *Proceedings of the Global Initiative on Late Blight Conference*. International Potato Center, Lima. 13-17pp.
- Alor Romero, N., Tierno, R., Cooke, D. E., y De Galarreta, J. I. R. (2019). "Characterisation of *Phytophthora infestans* Isolates of Potato Crops from Spain". *Potato Research*, 62(4): 453-463.
- Andrивon, D., Avendaño-Córcoles, J., Cameron, A. M., Carnegie, S. F., Cooke, L. R., Corbière, R. & Griffin, D. G. (2011). "Stability and variability of virulence of *Phytophthora infestans* assessed in a ring test across European laboratories". *Plant Pathology*, 60(3): 556-565.
- Bourke, A. (1993). "The visitation of god? The potato and the great Irish famine". *Lilliput Press Ltd*.
- Brasier, C. M. (2009). "*Phytophthora* biodiversity: how many *Phytophthora* species are there?. *Phytophthoras*". In *Forests and Natural Ecosystems*, vol. 101.
- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'souza, T. G., & Schulenburg, H. (2004). "A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level". *Molecular Ecology*, 13(7): 2101-2106.
- Cooke DEL y Lees A.K. (2004). "Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity". *Plant Pathology* 53 (6): 692–704.
- Cooke, D. E., Lees, A. K., Lassen, P., & Gronbech-Hansen, J. (2012). "Making sense of *Phytophthora infestans* diversity at national and international scales". In: *Proceedings of the Proceedings of Thirteenth EuroBlight workshop*. PPO-Special Report no. 15 (2012), 37 - 44.
- De Bary, A. (1876). "Researches into the nature of the potato-fungus-*Phytophthora infestans*".



- Journal of the Royal Agricultural Society of England*, 12. pp 239-269.
- Forbes, G. A., Goodwin, S. B., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordoñez, M. E., & Fry, W. E. (1998). "A global marker database for *Phytophthora infestans*". *Plant Disease*, 82(7): 811-818.
- Fry W. E. (2016). "*Phytophthora infestans*: New tools (and Old Ones) Lead to New Understanding and Precision Management". *Annual Review of Phytopathology*. Córdoba, España. 54(1):529-547.
- Fry W. E., Birch P. R. J., Judelson H. S., Grünwald N. J., Danies G., Everts K. L., Gevens A. J., Gugino B. K., Johnson D. A., Johnson S. B., McGrath M. T., Myers K. L., Ristaino J. B., Roberts P. D., Secor G., and Smart C. D. (2015). "Five Reason to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen". *Phytopathology*. Vol (105), Number 7. pp. 966-981.
- Fry, W.E. (2020). "*Phytophthora infestans*: the itinerant invader; "late blight": the persistent disease". *Phytoparasitica* 48, 87–94. <https://doi.org/10.1007/s12600-019-00778-3>
- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A. y Sandlan, K.P. (1993). "Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications". *Plant Disease*. 77, 653–661
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F. (2016). "Resistencia duradera al tizón tardío en papa a través de variedades dinámicas obtenidas por cis-génesis: avances científicos y sociales en el proyecto DuRPh". *Potato Research*, 59(1): 35-66.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). "Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction". *PeerJ*. pp 281.
- Kroon, L.P.N.M., Brouwer, H., De Cock A., Govers, F. (2012). "The Genus *Phytophthora* Anno 2012". *Phytopathology*, 102. pp 348-364.
- Lees Ak, Wattier R, Shaw Ds, Sullivan L, Williams Na Y Cooke, D.E.L. (2006). "Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations". *Plant Pathology* 55 (3): 311–319.



- Li, Y., Cooke, D. E., Jacobsen, E., & van der Lee, T. (2013). "Efficient multiplex simple sequence repeats genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*". *Journal of microbiological methods*, 92(3): 316-322.
- Lucca, M., y Huarte, M. (2012). "Avances en el control de Tizón Tardío". *XXV Congreso Latinoamericano de la Papa*. Consultado el (Vol. 8).
- Lucca, M.F., Restrepo, S., Danies, G., Acuña, I., Zanotta, S. (2019). "Monitoring of *Phytophthora* spp on potato crops and Solanaceous host in Latin America". In: *Proceedings of the Seventeenth Euroblight Workshop*. Special Report 19: 137-142.
- Mariette N, Mabon R, Corbiere R, Boulard F, Glais I, Marquer B, Pasco C, Montarry J, Andrivon D, (2016). "Phenotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive?" *Plant Pathology* 65: 577-586.
- Nei, M. (1978). "The theory of genetic distance and evolution of human races". *Japanese Journal of Human Genetics*, 23(4): 341-369.
- Njoroge, A. W., Andersson, B., Lees, A. K., Mutai, C., Forbes, G. A., Yuen, J. E., & Pelle, R. (2019). "Genotyping of *Phytophthora infestans* in Eastern Africa reveals a dominating invasive European lineage". *Phytopathology*, 109(4): 670-680.
- Oyarzún, P.J., Pozo, A., Ordoñez, M.E., Doucett, K., & Forbes, G.A. (1998). "Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador". *Phytopathology* 88:265-271.
- Reis, A.; Fabiana, H.S.; Ribeiro, L.A.; Maffia, E; Mizubuti, S.G. (2005). "Sensitivity of Brazilian Isolates of *Phytophthora infestans* to Commonly Used Fungicides in Tomato and Potato Crops". *Plant Disease*. 89(12):1279-1284.
- Rekad, F. Z., Cooke, D. E. L., Puglisi, I., Randall, E., Guenaoui, Y., Bouznad, Z., Y Cacciola, S. O. (2017). "Characterization of *Phytophthora infestans* populations in northwestern Algeria during 2008–2014". *Fungal Biology*, 121(5), 467-477.
- Schepers, H.T.A.M., Kessel, G.J.T., Lucca, F. et al. (2018). "Reduced efficacy of fluazinam against *Phytophthora infestans* in the Netherlands". *Eur J Plant Pathology* 151, 947–960. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1430-y>



- Shannon C.E. (2001). "A mathematical theory of communication". *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* 5:3–55.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148): 688-688.
- Stoddart Ja., Taylor Jf. (1988). "Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples". *Genetics* 118:705–711. Available at: <http://www.genetics.org/content/118/4/705>
- Zanotta, S. 2019. Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil. 124f. Tese (Doutorado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.



Anexo 1. Mapa Genotípico de *P. infestans* en Latinoamérica

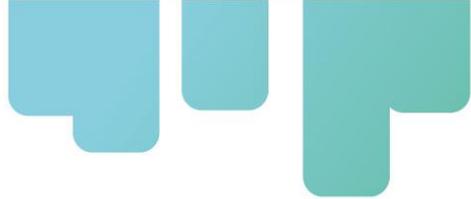
Mapa genotípico de *P. infestans* en Latinoamérica

Mapa de los genotipos amplificados en muestras de *P. infestans* colectadas en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina en el marco del Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG de Alertas tempranas de Tizón. Se distinguen los genotipos por color

Genotipo
■ EC_1 ■ EU_2_A1 ■ Other



Map: Florencia Lucca • Source: Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG • Created with Datawrapper



Anexo 2. Mapa de muestras de P. infestans colectadas

Mapa de muestras colectadas de *P. infestans* en Latinoamérica

Mapa con la distribución de las muestras colectadas de *P. infestans* en Panamá, Ecuador, Chile y Argentina en el marco del Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG de Alertas tempranas de Tizón. Se distinguen las muestras de cada país por color

Pais
■ Argentina ■ Chile ■ Ecuador ■ Panamá



Map: Florencia Lucca • Source: Proyecto Fontagro ATN/RF 16678-RG • Created with Datawrapper

Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org