UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

"Caracterización de seis poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* de las regiones Piura y Lima respecto de su resistencia a *Phytophthora infestans*"

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

José Alejandro Chang Kee Anselmo

LIMA – PERÚ

2016

Miembros del Jurado

PRESIDENTE

Dr. Jorge Rodríguez Babilón

VOCAL

Mg. Irene Delgado de la Flor

SECRETARIA

Dra. Claudia Machicado

ASESOR

Dr. Daniel Clark Leza

Índice

1. Introducción 1
2. Planteamiento del problema 13
3. Objetivos 16
3.1 Objetivo principal 16
3.2 Objetivos específicos 16
4. Materiales y métodos 17
4.1 Material vegetal 17
4.1.1 Semillas 17
4.1.2 Germinación de semillas 18
4.1.3 Crecimiento de las plantas 18
4.2 Ensayo de resistencia a *P. infestans* por inoculación de tipo "Detached-leaf" 20
4.3 Evaluación de presencia de genes de resistencia *Ph-2* y *Ph-3* en poblaciones de S. pimpinellifolium 22
4.3.1 Extracción de ADN de individuos de las seis poblaciones 22
4.3.2 Selección de marcadores moleculares 22
4.3.3 Amplificación directa del gen *Ph-3* 26
4.3.4 Secuenciamiento de fragmentos amplificados con dTG63-M 27
4.4 Análisis bioinformático de las regiones adyacentes a los marcadores dTG63 y TG328 y búsqueda de candidatos a genes de resistencia 28
4.4.1 Base de datos del genoma de S. pimpinellifolium 28
4.4.2 Ordenamiento de regiones de 2 kilobases 28
4.4.3 BLASTX 29
4.5 Análisis estadísticos 29
5. Resultados 30
5.1 Ensayo de resistencia a *P. infestans* 30
5.1.1 Aislamiento CIP638 30
5.1.2 Aislamiento POX100 34
5.2 Análisis molecular 38
5.3 Análisis bioinformático 41
5.3.1 En dTG63-O: 45
5.3.2 En TG328-O: 48

6. Discusión 50
7. Conclusiones 65
8. Recomendaciones 66
9. Referencias Bibliográficas.....67
10. Anexos.....74

RESUMEN

El tomate es una hortaliza de importancia mundial, pero muy susceptible al estrés biótico y abiótico. Entre los patógenos del tomate, *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío, es el que produce la mayor cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial. En la búsqueda de elementos de resistencia que puedan transferirse al tomate comercial, se vienen identificando especies silvestres de tomate resistentes al patógeno. La especie silvestre más investigada es *Solanum pimpinellifolium*, debido a su compatibilidad genética con el tomate comercial y a que comparte con éste varios atributos fenotípicos del fruto. A pesar de ser el Perú centro de origen de la especie, se han realizado pocos estudios a nivel poblacional. En este trabajo se caracterizó la respuesta de seis poblaciones de *S. pimpinellifolium* de las regiones Piura (Colán, Morante y Tambogrande) y Lima (Azpitia, Pantanos de Villa y UNALM) a la infección con dos aislamientos del patógeno *P. infestans* provenientes de Oxapampa e Ica por el ensayo "Detached-leaf". Se estimó el área dañada por el patógeno y el nivel de esporulación en la hoja. Asimismo, se evaluó la presencia de genes de resistencia *Ph-2* y *Ph-3* mediante marcadores moleculares tipo CAPS previamente descritos. Por último, la reciente liberación del genoma de tomate (*S. lycopersicum*) y de *S. pimpinellifolium* permitió hacer una exploración de regiones pequeñas del genoma para identificar los genes de resistencia *Ph-2* y *Ph-3* por medios bioinformáticos.

Los resultados no mostraron una diferencia significativa en la respuesta de las diferentes poblaciones a los aislamientos de *P. infestans*, si bien hubo una tendencia de la población Pantanos de Villa a mostrar una menor susceptibilidad. Sí se detectaron diferencias en la agresividad de los aislamientos, siendo el de Oxapampa más agresivo que el de Ica. Mediante el uso del marcador TG328 se confirmó la presencia del gen *Ph-3* en todas las poblaciones de *S. pinellifolium*, pero el marcador dTG63, ligado al gen *Ph-2*, no permitió obtener un producto de amplificación, por lo que la presencia/ausencia de este gen no pudo determinarse. El secuenciamiento con cebadores alternativos de la región que se pretendía amplificar confirmó que los cebadores dTG63 no permitían obtener un producto de amplificación por la presencia de mutaciones y ausencia de algunas bases. Por último, en base a la secuencia del genoma de tomate comercial ordenada y anotada, se construyeron secuencias de 200 kb alrededor de la posición reportada de los marcadores moleculares dTG63 y TG328 del genoma de *S. pimpinellifolium* e identificaron genes ligados a éstos, la mayoría asociados a factores de regulación de la expresión de genes, aunque ninguno con estructura de gen de resistencia fuera de *Ph-3*.

Es necesario enriquecer los datos de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* y otras especies silvestres de tomate, así como de los aislamientos de *P. infestans* en el Perú. La caracterización molecular de *S. pimpinellifolium* con aproximaciones técnicas de reciente desarrollo permitirá generar nuevos marcadores moleculares que faciliten el mapeo e identificación de más genes de resistencia.

SUMMARY

Tomato is a vegetable of worldwide importance, but very susceptible to biotic and abiotic stresses. Among tomato pathogens, *Phytophthora infestans*, which causes the late blight, produces the greatest economic losses worldwide. In search of resistance elements that can be transferred to the commercial tomato, wild species resistant to this pathogen are being identified. *Solanum pimpinellifolium* is the most studied wild tomato specie, due to its genetic compatibility with commercial tomato, and the fact that they share many fruit phenotypic attributes. Despite the fact of Peru being the center of origin of this species, there have been few studies at a population level. In this work, we characterize the response of six populations of *S. pimpinellifolium* of regions Piura (Colán, Morante, and Tambogrande), and Lima (Azpitia, Pantanos de Villa, and UNALM) to the infection of two isolates of *P. infestans* from Oxapampa, and Ica using the "Detached-leaf" assay. The area damaged by the pathogen, and the level of sporulation in the leaf was calculated. Also, the presence of resistance genes *Ph-2* and *Ph-3* using CAPS molecular markers was evaluated. Finally, recent genome release of tomato (*S. lycopersicum*), and *S. pimpinellifolium* allowed a scan of small regions of the genome to identify the resistance genes *Ph-2* and *Ph-3* by bioinformatics means.

The results showed no significant differences in the response of different populations to the *P. infestans* isolates, although there was a trend of the Pantanos de Villa population to be less susceptible. A difference in aggressiveness between both *P. infestans* isolates was detected, the one from Oxapampa being more aggressive than that from Ica. The presence of the *Ph*-3 gene in all populations of *S. pimpinellifolium* was confirmed by using the TG328 marker, but dTG63, linked to the *Ph-2* gene, did not allow the generation of an amplified product, so the presence/absence of this gene could not be determined. By sequencing the region of interest with alternative primers, it was confirmed that dTG63 primers could not allow obtaining an amplified product due to the presence of mutations and deletions. Finally, based on the annotated tomato genome sequence, a 200 kb sequence was constructed around the reported position for the molecular markers dTG63 and TG328 of the *S. pimpinellifolium* genome, and genes linked to the markers were identified. Most of them were related to regulation factors of gene expression, though none of them with a resistance gene structure, aside from *Ph-3*.

It is necessary to acquire more data on the populations of *S. pimpinellifolium* and other wild tomato species, as well as on isolates of *P. infestans* in Peru. The molecular characterization of *S. pimpinellifolium* with newly developed technical approaches will allow the generation of new molecular markers that shall facilitate mapping and identifying more resistance genes.

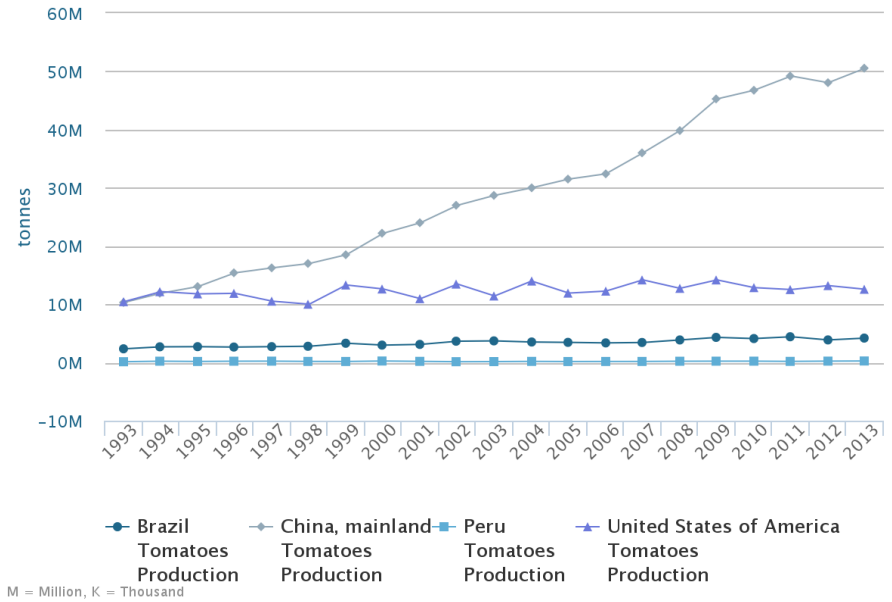
1. Introducción

El tomate es considerado como una de las cinco hortalizas más importantes del mundo por sus abundantes propiedades y usos múltiples, siendo cultivada regularmente en campos o invernaderos (FAOSTAT 2015). El mejoramiento de esta solanácea ha sido un proceso continuo, orientado a obtener una mayor calidad del fruto respecto de su valor nutritivo y al control de su tiempo de maduración, pero también dirigido a conferirle a la planta resistencia contra diversos tipos de estrés abiótico (frío, sequía, altas y bajas temperaturas) y biótico (insectos fitófagos, micro-patógenos, entre otros) (Robertson & Labate, 2007; Cocaliadis, 2013) (Imagen 1).

Imagen 1 Campo de cultivo de tomate

Con el incremento de la población mundial, el consumo de tomate ha aumentado considerablemente y los agricultores, agrónomos y horticultores exploran diferentes estrategias para mejorar la producción sin disminuir la calidad del producto. Esta producción es liderada a nivel mundial por China (50,552,200 ton) y E.E.U.U. (12,574,550 ton), y a nivel de Sudamérica por Brasil (4,187,646 ton) (Gráfico 1).

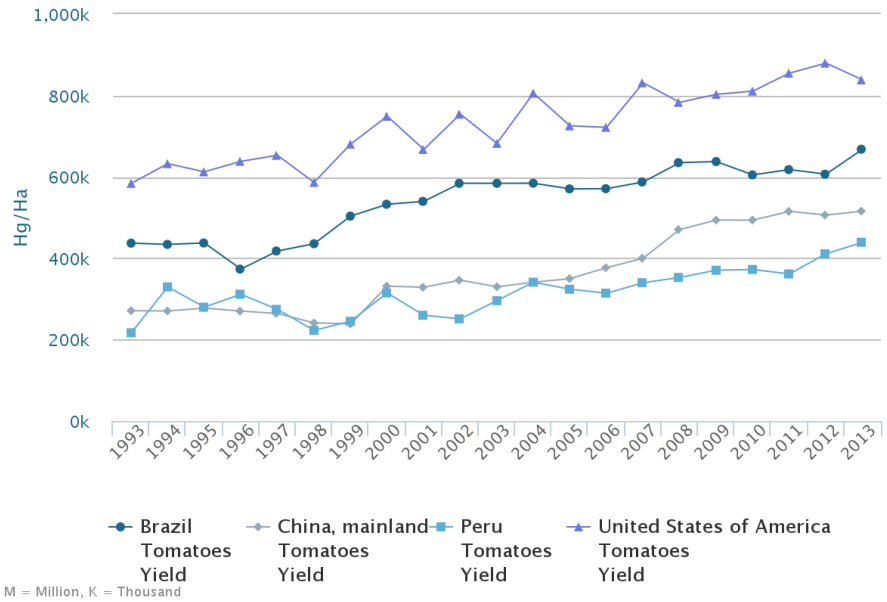
Gráfico 1. Producción de tomate de los últimos 10 años en los principales países productores y el Perú



FAOSTAT 2015

La producción total del Perú es muy pequeña en comparación con estos números, tan solo 253,543 ton en 2013. Su productividad no es tan baja (439,238 hg/ha), comparable a la de China (515 786 hg/ha), pero menor que la de los E.E.U.U. (838 432 hg/ha) (Gráfico 2). Esta producción está concentrada en un 52% en el departamento de Ica, mientras que el resto se divide entre Lima (18%), Arequipa (11%) y Lambayeque (4%) principalmente (INEI 2014).

Gráfico 2. Productividad de tomate de los últimos 10 años en los principales países productores y el Perú.



FAOSTAT 2015

Como todas las plantas cultivables, el tomate ha evolucionado bajo la selección del hombre, y ello ha determinado que en ocasiones se pierdan genes de resistencia a cambio de mejoras en la calidad del fruto o en la producción en general (Sim *et al.* 2009). A pesar de que existen muchas variedades de tomate cultivable (*Solanum lycoperscium*) a nivel mundial, éstas no muestran un alto grado de diversidad, lo que ha sido comprobado por una escasez de marcadores polimórficos (Labate & Baldo, 2005; Moyle, 2008). Miller & Tanksley (1990) ya habían reportado que dentro del género de tomate (en ese entonces *Lycopersicon*), el tomate comercial aporta menos del 5% de la variabilidad genética total. La poca variabilidad de *S. lycopersicum* queda en evidencia si se considera que existe mayor variabilidad genética dentro de una sola accesión del tomate silvestre *S. peruvianum* (la más lejana filogenéticamente y autoincompatible) que en todas las accesiones de *S. lycopersicum* (autocompatible), lo que resalta la importancia del estudio

de las especies silvestres. En lo que se refiere a su desempeño frente a condiciones adversas, la gran mayoría de las variedades cultivables presentan los mismos niveles de susceptibilidad a diversos tipos de estrés. Una medida para contrarrestar esta debilidad ha consistido en realizar cruces del tomate comercial con especies silvestres que posean resistencias o tolerancias a estos estreses (Sharma *et al.*, 2008; Nowicki *et al.*, 2012; Nowakowska *et al.*, 2014).

Imagen 2 Diferentes especies de tomate silvestre

1 *Solanum chilense*

2 *Solanum cheesmanii*

3 *Solanum peruvianum*

4 *Solanum pimpinellifolium*

El origen del tomate está en los Andes, y en Sudamérica existe una gran cantidad de especies silvestres, sobre todo en el Perú (Imagen 2). Estas especies tienen distintos grados de cercanía filogenética a *S. lycopersicum*, siendo *S. chesmanii* y *S. pimpinellifolium*

las más cercanas, mientras que *S. chilense*, *S. peruvianum* y *S. pennellii* son las más lejanas (Rattan & Saini, 1979; Irzhansky & Cohen, 2006; Foolad, 2007; Moyle, 2008). De todas estas, la más empleada para cruces con *S. lycopersicum* es *S. pimpinellifolium*, y esto obedece a tres factores: 1) *S. pimpinellifolium* posee resistencias a los estreses que afectan a tomate; 2) las características del fruto son parecidas, incluso en pigmentación, algo deseado por los productores; y 3) la facilidad de cruce entre ambas plantas (Zuriaga *et al.*, 2009).

Solanum pimpinellifolium es una leguminosa perenne anual, oriunda de Sudamérica, específicamente de Ecuador y Perú. Sus frutos comparten ciertas características con los del tomate comercial a nivel organoléptico, aunque son más pequeños (diámetro = 1 cm, Imagen 3). Si bien son ocasionalmente utilizados para el consumo humano, solo son consumidos en las regiones donde crecen de manera silvestre. Aun así, su uso es extendido como fuente de germoplasma entre los productores de tomate cultivable debido a que las plantas son compatibles entre sí, ambas son diploides y tienen un igual número de cromosomas (Rick & Fobes, 1975; Rick & Chetelat, 1995). Además, *S. pimpinellifolium* presenta la más alta cantidad de polimorfismos novedosos con respecto al genoma de *S. lycopersicum* entre las especies autocompatibles de tomate, lo que acrecienta su importancia para el mejoramiento de las variedades cultivables (Miller & Tanksley, 1990).

Imagen 3 Frutos de *Solanum pimpinellifolium*

Entre los muchos retos que afronta el cultivo de tomate, uno de los principales es la enfermedad conocida como tizón tardío. Ésta es causada por el patógeno *Phytophthora infestans*, considerado como una de las plagas más contagiosas y destructivas entre las que afectan a las especies vegetales. Su presencia puede ser rastreada hasta el siglo XIX, cuando fue el causante de la gran hambruna irlandesa entre los años 1845 al 1849 al destruir casi por completo los campos de papa (*Solanum tuberosum*) de los que la economía de este país era dependiente. Durante el resto del siglo XIX hasta la actualidad, este patógeno ha sido motivo de un gran número de estudios que han buscado entender su biología para contrarrestar su mecanismo de acción. Es tanto el daño que puede causar *P. infestans* que ha sido considerado como una de las posibles armas a ser usadas en caso de una guerra biotecnológica (citado en Madden & Wheelis, 2003). No en vano *Phytophthora infestans* significa “destructora de plantas” en griego.

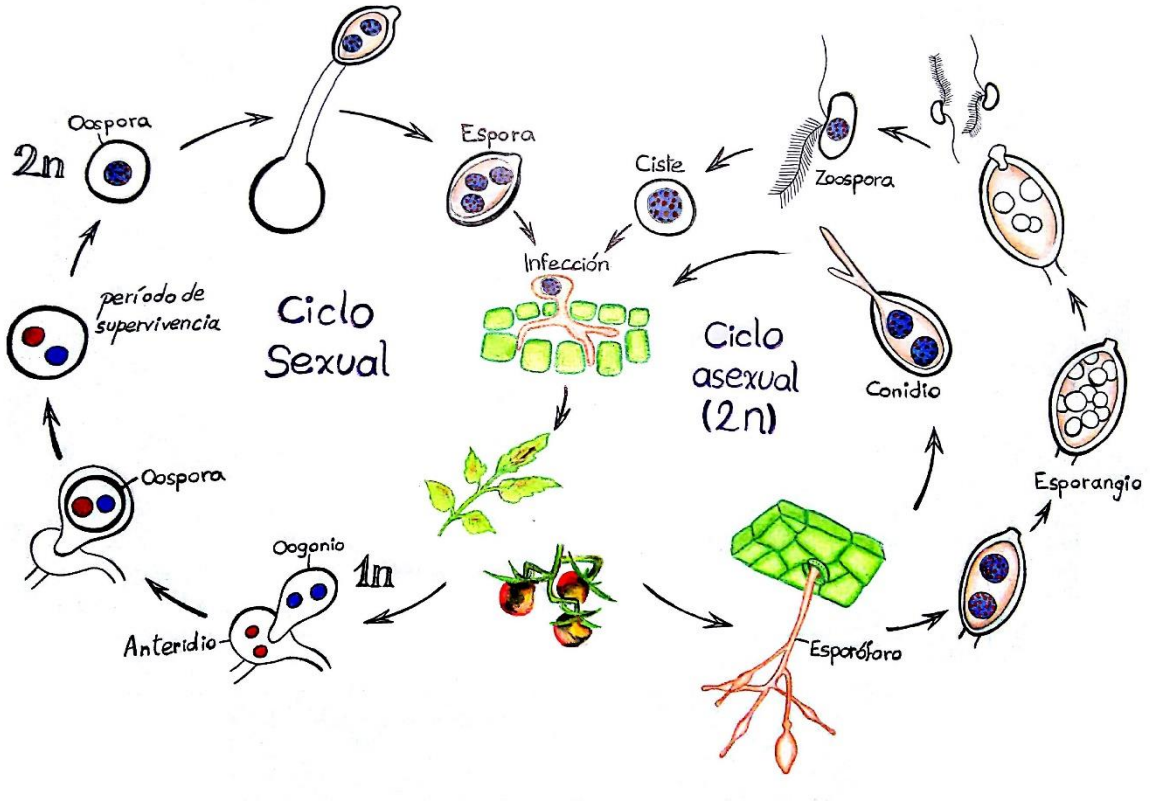
P. infestans es un oomiceto heterotálico y un patógeno hemibiotrófico casi obligado en condiciones naturales y agrícolas, que infecta distintas solanáceas, entre ellas el tomate y la papa. Su gran capacidad para superar las defensas de las plantas se explica, en gran

medida, por su capacidad de reproducción sexual y asexual (Imagen 4). El ciclo asexual es el que lleva al patógeno a ser considerado una epidemia durante sus temporadas de actividad. Las esporas transportadas por el viento caen sobre el tejido vegetal, y de existir una capa de agua que permita su motilidad, penetran en el sitio de infección (Hardham & Blackman, 2010). La germinación de las esporas sigue dos rutas posibles: si la temperatura oscila entre 20 y 25°C, ocurre una germinación directa de las esporas en el tejido, mientras que si la temperatura oscila entre 10 y 15°C, se producen zoosporas que se pueden mover por un periodo de tiempo, muchas veces menor que 1 hora, para luego enquistarse y finalmente formar un tubo germinal que les permite penetrar los tejidos (Nowicki *et al.*, 2013). La formación de zoosporas obedece a una estrategia para sobreponerse a las condiciones climáticas en las que la infección puede ocurrir, aumentando la patogenicidad de *P. infestans*. Los tubos germinales se diferencian en apresorios que atraviesan a la cutícula de la hoja y luego forman hifas intercelulares que, valiéndose de haustorios, le permiten al oomiceto obtener sus nutrientes a partir de las células del mesófilo (Nowicki *et al.*, 2013). Posteriormente se forman esporangios con miles de esporas que pueden ser diseminadas para dar pie a que el ciclo se repita y amplifique.

Como oomiceto heterotálico, *P. infestans* requiere dos tipos, A1 y A2, para el apareamiento durante la reproducción sexual (Fry, 2008). Esta fertilización produce una oospora que sirve como estructura de supervivencia y como fuente de variación por recombinación sexual. Las oosporas pueden subsistir por muchos años en el suelo (Mayton *et al.*, 2000). La reproducción sexual permite la aparición de nuevas variedades

del patógeno, algunas de las cuales resultan más agresivas que sus predecesoras y terminan por superar los mecanismos de resistencia que las plantas pudiesen desarrollar. Esto es lo que hace a este patógeno tan peligroso y temido a nivel agrícola. La enfermedad avanza rápidamente bajo condiciones de alta humedad (lluvias, rocío o neblina), en particular si la temperatura es baja. Además, las esporas producidas son fácilmente dispersadas por el viento hasta 45 km. a la redonda, por lo que un manejo inadecuado puede determinar el desarrollo de epidemias en extensiones grandes de cultivos de tomate y papa, con consecuencias graves para la producción. Al respecto, en el 2007 se perdieron aproximadamente 638,900 ton de tomate procesado en la mayor área de producción de China, la ciudad de Bayannur, en la parte central y occidental de la Mongolia Interior (Zhang *et al.*, 2013). Asimismo, en el año 2009 en E.E.U.U. se produjo una pérdida combinada de más de 100 millones de dólares entre tomate fresco y procesado, debido a una epidemia de *P. infestans* (Nowicki *et al.* 2012; Fry *et al.* 2013). En la actualidad, la preocupación por el peligro latente que este patógeno representa lleva a que se continúen las investigaciones para contrarrestar su avance en diversos países a nivel mundial (Goodwin & Drenth, 1997; Vleeshouwers *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Garry *et al.*, 2005; Petchaboon *et al.*, 2014).

Imagen 4 Ciclo reproductivo de *Phytophthora infestans*



Si bien en sus inicios el tizón tardío fue estudiado en papa, sus efectos en tomate han hecho que los estudios se extiendan a este cultivo. Hasta hace poco las razas de *P. infestans* eran especie-específicas y no existía peligro de que una especie pudiera contagiar a otra. Esto ha cambiado, y ahora se observan razas más agresivas de este patógeno con capacidad de infectar a papa y tomate indiscriminadamente (Foolad, 2008). Así como ocurre con la papa, los cultivos de tomate pueden sufrir en la actualidad destrucción total si no se toma medidas de manejo que involucren el uso de pesticidas debido a que el patógeno puede afectar directamente al fruto y matar las plantas (Foolad, 2008; Fry, 2008; Nowicki *et al.*, 2013).

Debido al potencial de daño que representa *P. infestans*, la búsqueda de genes de resistencia en especies relacionadas con el tomate cultivable es una labor que se lleva a cabo desde mediados del siglo pasado (Imagen 5). Entre las especies con mayor cercanía filogenética, *Solanum pimpinellifolium* es la más utilizada para este fin y en ella se han descrito hasta 5 genes de resistencia (R) contra esta enfermedad, denominados genes *Ph*, que incluyen los genes *Ph-1* (Peirce, 1971), *Ph-2* (Moreau *et al.*, 1998), *Ph-3* (Black et al. 1996), *Ph-4* (Labate *et al.*, 2007) y *Ph-5* (Foolad *et al.*, 2006), ubicados en los cromosomas 7, 10, 9, 2 y 1 respectivamente (Peirce, 1971; Moreau *et al.*, 1998; Chunwongse *et al.*, 2002; Foolad *et al.*, 2006; Labate *et al.*, 2007). *Ph-1* es un gen de dominancia total que provee resistencia contra la raza T-0 de *P. infestans*, pero esta resistencia ha sido rápidamente superada por nuevas razas del patógeno (Peirce, 1971). Por ello, se considera que la resistencia conferida es pobre, además de no contar con un marcador molecular asociado que permita su rápida detección. *Ph-2*, por otro lado, es un gen de dominancia parcial obtenido a partir de estudios de cruzas entre *S. lycopersicum* var. Hawaii7996 (susceptible a tizón tardío) y *S. pimpinellifolium* WVa700 (resistente a tizón tardío). Este gen está ubicado en la parte distal del brazo largo del cromosoma 10 de *S. pimpinellifolium*, en un intervalo de 8.4 cM, y entre los marcadores CP105 y TG233. Su presencia determina una interferencia con el progreso de la enfermedad, aunque no la detiene (Moreau *et al.*, 1998). De hecho, no se ha observado que provea resistencia alguna en el caso de las razas más agresivas de *P. infestans* (Goodwin *et al*, 1995; Black *et al.*, 1996). En los últimos años se han desarrollado en la Universidad de Cornell nuevos

marcadores moleculares para su detección basados en PCR (M. Mutschler, comunicación personal).

Imagen 5 Daño causado por *Phytophthora infestans* a un cultivo de tomate

Tomado de Fry *et al.* 2013

En lo que respecta a *Ph-3*, este gen fue inicialmente descrito como un gen dominante de resistencia a *P. infestans* (Black *et al.*, 1996), descubierto en la accesión L3708 de *S. pimpinellifolium* en el Centro Asiático de Desarrollo e Investigación de Vegetales (AVRDC por sus siglas en inglés) de Taiwán. Hasta el año 2012 se había reportado que era mucho más eficaz que otros genes *Ph* al encontrarse que proveía resistencia a un amplio rango de aislamientos de *P. infestans*, incluyendo algunos que superaban la resistencia conferida por *Ph-1* y *Ph-2*. El gen se ubica en el brazo largo del cromosoma 9, cerca al marcador RFLPk TG591a (Chunwongse *et al.*, 2002). A pesar de la mejora mostrada con respecto a sus predecesores, se sugiere que la resistencia total observada en la accesión L3708 está

dada por varios genes, puesto que la transferencia de *Ph-3* a plantas susceptibles en condiciones heterocigóticas u homocigóticas no confiere una resistencia robusta contra aislamientos muy agresivos como el US-7 o US-17, comunes en los E.E.U.U. (Kim & Mutschler, 2005). Los genes *Ph-4* y *Ph-5*, por su parte, han sido recientemente reportados y las plantas que los portan muestran resistencia a una amplia variedad de razas de *P. infestans*, pero aún no existen marcadores moleculares asociados a ellos (Foolad *et al.*, 2006; Labate *et al.*, 2007).

Además de los genes de resistencia encontrados, se han identificado varios loci cuantitativos de atributo (QTL, por sus siglas en inglés) que confieren resistencia inespecífica al tizón tardío en otra especie de tomate silvestre *Solanum habrochaites*. Brouwer *et al.* (2004) han identificado QTL promisorios en la accesión LA 2099 de *S. habrochaites*, aunque tienen la desventaja de estar ligados a características no deseadas. Ello ha determinado que su introducción en tomates comerciales no se haya producido todavía (Brouwer & St. Clair 2004). También se han encontrado QTL de resistencia a tizón tardío en la accesión LA 1777 de *S. habrochaites* (Junming Li et al. 2011). Se estima que hasta 29 genes estarían involucrados en esta característica, por lo que su transferencia a tomates comerciales es aún complicada (Abreu *et al.* 2008).

En el Perú, sólo se ha encontrado *P. infestans* del tipo parental A1, sin presencia observable del tipo A2 (Abad, 1983; Tooley *et al.*, 1989; Ortiz *et al.*, 1999). Pérez *et al*. (2001) reportaron que si bien hasta ese momento el linaje dominante había sido el US-1,

éste empezaba a ser desplazado por el linaje EC-1. También observaron la presencia de los linajes PE-3, PE-5 y PE-6, aunque en una menor proporción y restringidos a determinadas zonas del país. Garry *et al.* (2005) no encontraron una asociación entre los linajes EC-1, US-1, PE-3 y PE-7 con el hospedero del que fueron aislados, demostrándose que en el caso del Perú, la estructura poblacional del patógeno no está determinada por el hospedero, como sí ocurre en Méjico (Grünwald *et al.*, 2001). Por su parte, Goss *et al.* (2014) demostraron de forma concluyente que el origen de *P. infestans* está en Méjico, y propusieron que su presencia en los Andes se debe a un evento migratorio global y a otros eventos migratorios que han dado lugar a hibridaciones entre poblaciones, lo que explicaría la presencia de los linajes US-1, EC-1, PE-3 y PE-7 en el Perú.

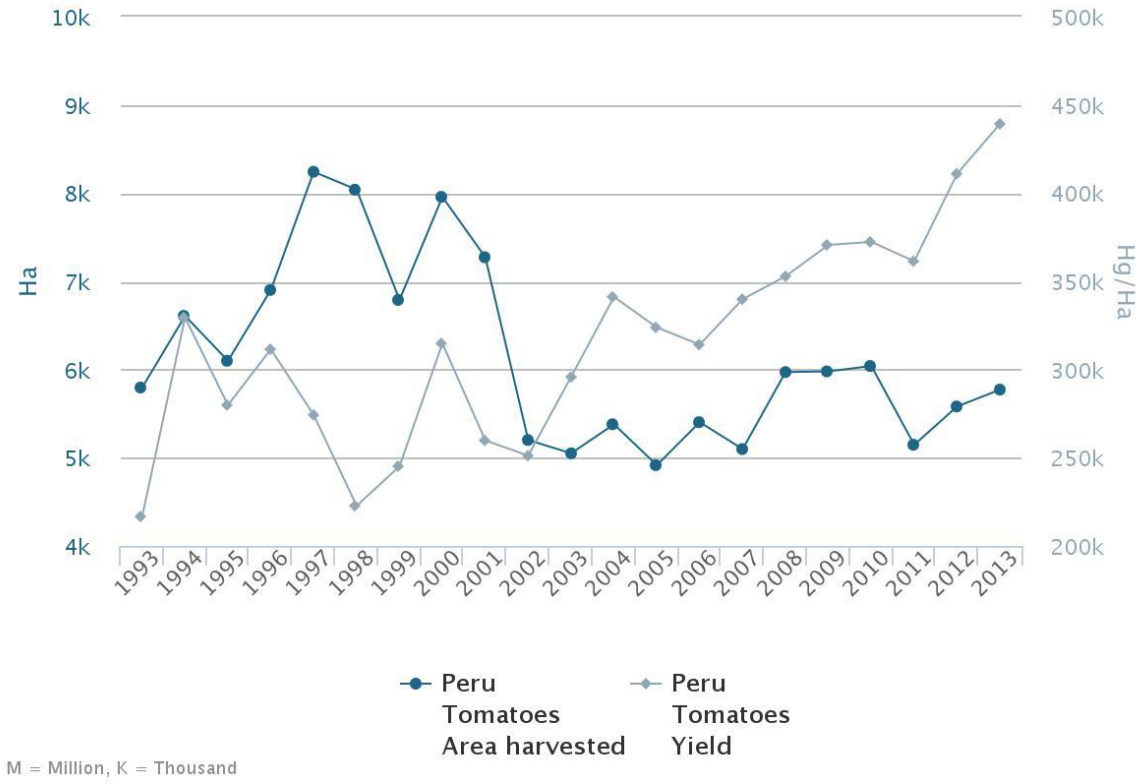
2. Planteamiento del problema

El Perú es una fuente importante de germoplasma de especies silvestres de tomate, pero hasta ahora no se han realizado estudios comparativos de las diferentes poblaciones existentes en lo que respecta a características específicas de resistencia a nivel biótico como abiótico. En general, las diferentes accesiones que se tienen en bancos de germoplasma de *Solanum pimpinellifolium* a nivel mundial provienen del Perú, en especial de Piura, pero *S. pimpinellifolium* se encuentra presente a lo largo de toda la costa.

En cuanto a *Phytophthora infestans*, se conoce de su presencia en el Perú y se tiene localizadas las diferentes áreas geográficas en las que se encuentran distribuidos los linajes presentes en el país. Como fue mencionado previamente, este patógeno ataca toda

la familia *Solanaceae* y los estudios realizados están enfocados principalmente en papa, más aún en el Perú, un importante productor a nivel mundial de este tubérculo. Sin embargo, debe considerarse el daño significativo que puede producir a los cultivos de tomate, los que se espera mejoren su producción a nivel nacional como se viene observando en la actualidad (Gráfico 3).

Gráfico 3. Producción y cosecha de tomate en el Perú durante los últimos 20 años



FAOSTAT 2015

Este aumento no va a ser sostenible si no se llevan a cabo estudios más profundos que ayuden a superar potenciales problemas en la producción de tomate, como son las plagas por patógenos. Al ser *P. infestans* una de las principales plagas de esta especie, se hace importante caracterizar los genes de resistencia asociados, para lo cual las poblaciones

locales del tomate silvestre *S. pimpinellifolium* son de suma importancia. Entre los genes de resistencia a *P. infestans*, *Ph-2* y *Ph-3* son los que en hasta hoy han dado mejores resultados en la lucha contra esta plaga debido a que, en conjunto, han demostrado generar resistencia contra múltiples razas de este patógeno. No obstante, las razas presentes en el Perú, mayormente del linaje EC-1, no son las mismas que las que las que predominan en los E.E.U.U. y que han sido utilizadas en estos estudios de resistencia.

En este sentido resulta de suma utilidad la reciente liberación del genoma de *S. pimpinellifolium* (aunque sólo como un "draft"; http://solgenomics.net/), al abrir el camino a muchas posibilidades de exploración y estudio a nivel bioinformático. La búsqueda de genes de resistencia mediante el análisis de las secuencias con programas de búsqueda de microsatélites y secuencias repetitivas, o a través de anotadores moleculares, entre otras aproximaciones, han permitido identificar nuevos genes, algunos de los cuales han demostrado ser funcionales en experimentos posteriores (Gale & Devos, 1998; Sanseverino *et al.*, 2010; Andolfo *et al.*, 2013). Dadas las ventajas informáticas actuales y el acceso nuevos programas, muchos de ellos gratuitos, tenemos múltiples opciones para elegir cómo hacer análisis. En este caso, resulta de interés hacer una búsqueda de candidatos a genes de resistencia en las cercanías de los marcadores para *Ph-2* (dTG63) y *Ph-3* (TG328), pues podría ampliar el espectro de genes involucrados en la respuesta a *P. infestans* y servir como punto de partida para posteriores investigaciones.

Esta propuesta, entonces, pretende realizar un estudio comparativo entre diferentes poblaciones locales de *S. pimpinellifolium* pertenecientes a la zona norte del país (Piura) y

a la zona centro (Lima) con respecto a su respuesta al patógeno *P. infestans* y la relevancia de ella en los genes *Ph-2* y *Ph-3*. Para ello se utilizará dos aislamientos pertenecientes al linaje EC-1 de *P. infestans*, predominante en el Perú, colectados en Oxapampa e Ica. Además, se realizará un primer análisis bioinformático exploratorio de los potenciales genes de resistencia presentes en las cercanías de los marcadores moleculares para *Ph-2* y *Ph-3*.

Los datos obtenidos a partir de este estudio permitirán identificar direcciones que las investigaciones en resistencia del tomate a aislamientos locales de *P. infestans* podrían tomar en un futuro, así como determinar la utilidad de algunos datos obtenidos en investigaciones realizadas en otros países para la interpretación de fenómenos locales.

3. Objetivos

3.1 Objetivo principal

Explorar la respuesta de seis poblaciones peruanas de *Solanum pimpinellifolium* a aislamientos locales del patógeno *Phytophthora infestans* e iniciar la búsqueda bioinformática de genes de resistencia potencial en esta especie de tomate silvestre.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la susceptibilidad/resistencia a los aislamientos locales CIP638 y POX100 de *Phytophthora infestans* en seis poblaciones peruanas de *Solanum pimpinellifolium*.

- Determinar la presencia de dos marcadores moleculares del tipo CAPS asociados a resistencia a *Phytophthora infestans* en seis poblaciones peruanas de *Solanum pimpinellifolium*.
- Realizar una evaluación bioinformática del genoma de *S. pimpinellifolium* en búsqueda de posibles genes de resistencia biótica en las cercanías de las regiones de los marcadores moleculares dTG63 y TG328.

4. Materiales y métodos

4.1 Material vegetal

4.1.1 *Semillas*

Las semillas de las distintas poblaciones de *S. pimpinellifolium* incluidas en el estudio fueron colectadas a partir de frutos obtenidos de plantas de Piura (marzo del 2009) y Lima (diciembre 2010).

Los frutos de *S. pimpinellifolium* son fácilmente identificables debido a su color rojo característico, así como su tamaño de un diámetro máximo de 1 cm. Cabe resaltar que estas plantas crecen en grupos pequeños en los lugares de colecta mencionados (5 a 30 plantas), facilitando la toma de muestras representativas del lugar.

La identificación de plantas se llevó a cabo utilizando la guía taxonómica de Peralta *et al*. (2008) para especies silvestres de tomate.

Las coordenadas de colecta fueron las siguientes:

Tabla 1. Sitios de colecta de semillas de *Solanum pimpinellifolium*

Población	Región	Latitud sur	Longitud oeste
Azpitia	Lima	12°35.30'	76°37.47'
Pantanos de Villa	Lima	12°13.122'	76°58.933'
UNALM	Lima	12°4.95'	76°58.81'
Colán	Piura	4°53.80'	80°59.81'
Morante	Piura	5°25.45'	80°14.85'
Tambogrande	Piura	5°06.25'	80°36.02'

4.1.2 Germinación de semillas

Las semillas de las diferentes poblaciones se hicieron germinar mediante un protocolo de escarificación estandarizado para estas plantas que consistió en:

- Inmersión de 20 a 30 semillas en 20 mL de una solución de lejía al 2.7% en un vaso de 100 mL de capacidad y agitación (200 rpm) durante 10 minutos.
- Eliminación la solución de lejía y realización de 3 lavados con 50 mL de agua destilada y agitación suave durante 15 segundos.
- Inmersión en 40 mL de una solución líquida de medio MS 0.5X y agitación entre 4 y 5 días.

Al cabo de este último tiempo, se obtuvo plántulas de dos a tres centímetros de altura con presencia de dos cotiledones y una raíz incipiente.

4.1.3 Crecimiento de las plantas

Las plántulas se transfirieron a almácigos con sustrato enraizante, los cuales fueron colocados en un cuarto de cultivo bajo condiciones controladas (temperatura de 25°C y

fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad). Después de mantenerlas ahí entre 7 y 10 días, las plántulas fueron transferidas a macetas de plástico con una mezcla de tierra hoja/arena fina lavada en proporción 2:3. Las macetas se colocaron en un tinglado por un periodo de 3 a 4 semanas hasta que las plantas alcanzaron el tamaño adecuado para realizar los ensayos de resistencia (ver sub-sección siguiente). No se aplicó fungicidas ni abonos foliares que pudiesen interferir con el desarrollo de *P. infestans* en dichos ensayos.

Imagen 6. Plantas de *Solanum pimpinellifolium* luego de 2 semanas de crecimiento en cuarto de cultivos

4.2 Ensayo de resistencia a *P. infestans* por inoculación de tipo "Detached-leaf"

Para este ensayo se utilizaron plantas con 3 a 4 semanas de crecimiento en tinglado, periodo en el cual éstas alcanzaron un tamaño de 60-80 cm (parte aérea), con hojas de aproximadamente 4 cm x 3 cm (Imagen 7a). En cuanto a *P. infestans* se utilizaron los aislamientos POX100 (Oxapampa) y CIP638 (Ica), ambos pertenecientes al genotipo EC-1 de mayor presencia en el Perú.

Se tomaron foliolos del tercio medio de la planta sin síntomas de cualquier otra enfermedad o signos de daño mecánico. Se lavaron con agua desionizada o destilada mediante suave inmersión para eliminar las impurezas de la superficie de las hojas y se secaron cuidadosamente con papel toalla. Los foliolos fueron colocados en placas Petri con agar agua al 1.5% con el envés hacia el agar y se mantuvieron en frio (4°C) hasta el momento de la inoculación.

En paralelo se cosecharon en agua destilada estéril esporangios de los dos aislamientos de *P. infestans* a partir de hojas de tomate usadas para propagar al inóculo. Se filtró la suspensión con membranas de 30 µm y 10 µm. Con ayuda de un hemacitómetro se contaron los esporangios presentes en la cámara superior e inferior. La suma se dividió entre dos y se multiplicó por 300, con lo que se obtuvo el número de esporangios por mililitro. A partir de esta suspensión "stock" se prepararon las suspensiones a la concentración deseada.

Imagen 7. Fases en proceso de ensayo de infección por método Detached-leaf

a) Plantas de *Solanum pimpinellifolium* de las poblaciones de Azpitia (primera y segunda columna desde la izquierda) y Colán (columnas tercera y cuarta), crecidas en tinglado a la cuarta semana

b) Foliolos infectados con *P. infestans*

c) Delimitación del área de daño en la hoja

En el caso de b) podemos notar diferentes intensidades en la esporulación, mostrado como un área blanquecina sobre el envés de la hoja. En c), se ha trazado en rojo el área que ocupa el daño causado por *P. infestans* con respecto al área total del foliolo para determinar la severidad.

Cada foliolo se inoculó con 10 µL de una suspensión de 1500 esporangios/mL. Por cada individuo evaluado se tomaron 3 hojas, cada una compuesta de 3 a 5 foliolos. Para cada población se tomaron 3 individuos de manera que fuese estadísticamente significativa.

Las placas se incubaron primero a 15°C en oscuridad y luego de 24 horas se incubaron a 18°C con períodos de luz de 14 horas luz / 10 horas de oscuridad por 6 días. Después de

este tiempo, se realizó la evaluación del porcentaje estimado de área foliar afectada y el grado de esporulación (Imagen 7b, c). Para este último parámetro se consideraron las categorías siguientes:

1 = Poca esporulación, visible con la ayuda de un esteromicroscopio.

2 = Moderada esporulación

3 = Abundante esporulación

4.3 Evaluación de presencia de genes de resistencia Ph-2 y Ph-3 en poblaciones de S. pimpinellifolium

4.3.1 Extracción de ADN de individuos de las seis poblaciones

La extracción de ADN se hizo por el método modificado de extracción de hojas con CTAB (Doyle & Doyle, 1987; Anexo 1).

4.3.2 Selección de marcadores moleculares

Se utilizó como punto de partida dos marcadores del tipo CAPS desarrollados para detectar la presencia de los genes *Ph-2* y *Ph-3*. En todos los casos los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% luego de separar las bandas a un voltaje constante de 85 V durante 40 minutos.

dTG63 (*Ph-2*)

El marcador CAPS para *Ph-2* es denominado dTG63 y ha sido desarrollado por Martha Mutschler de la Universidad de Cornell. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

dTG63 Forward	5'-CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTG-3'
dTG63 Reverse	5'-AATAATTTTCAACCATAGAATGATT-3'

La composición de las reacciones y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Para una reacción dTG63	
Reactivo	**Volumen (µL)**
ddH_2O	18,8
Buffer 10X	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	1,5
Primer F (10 µM)	0,5
Primer R (10 µM)	0,5
dNTP (10 mM)	0,5
TaqPol (5 U/ µL)	0,2
Muestra (20 ŋg/ µL)	0,5
TOTAL	25

Ciclo de amplificación dTG63		
1 ciclo	94°C	2 min
35 ciclos	94°C	30 seg
	60°C	30 seg
	72°C	20 seg
1 ciclo	72°C	5 min
Guardado	4°C	∞

El producto de amplificación esperado es una secuencia de 246 pares de bases (en adelante “pb”). Luego de la amplificación se realiza una digestión con la enzima

*Hinf*I, que reconoce el sitio de restricción 5'-G'ANTC-3'. La presencia del gen *Ph-2* está asociada con la ausencia de este sitio de restricción.

En vista de las dificultades encontradas en el uso del par de cebadores para dTG63 (ver Discusión), se diseñó un nuevo par de cebadores para amplificar una región que contuviese a dTG63 (Anexo 3). Las secuencias de estos cebadores alternativos fueron las siguientes:

dTG63-M-Forward	5'- GGTTGATGAAAATGACATGAG-3'
dTG63-M-Reverse	5'-CATGTCCAGTTGAGGAGCGAG-3'

La composición de las reacciones y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Para una reacción dTG63-M	
Reactivo	**Volumen (µL)**
ddH_2O	18,8
Buffer 10X	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	1,5
Primer F (10 µM)	0,5
Primer R (10 µM)	0,5
dNTP (10 mM)	0,5
TaqPol (5 U/ µL)	0,2
Muestra (20 ηg/ µL)	0,5
TOTAL	25

Ciclo de amplificación dTG63-M		
1 ciclo	94°C	30 seg
35 ciclos	94°C	20 seg
	55°C	20 seg
	72°C	1 min
1 ciclo	72°C	7 min
Guardado	4°C	∞

En este caso, el producto de amplificación esperado es una secuencia de 408 pb y, tal como ocurre con el par de cebadores original, la presencia del gen *Ph-2* debe asociarse con la ausencia del sitio de restricción 5'-G'ANTC-3' reconocido por *Hinf*I.

TG328 (*Ph-3*)

El marcador CAPS para *Ph-3* es denominado TG328 y ha sido desarrollado por Robbins *et al.* (2010). Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

dTG63 Forward	5'- GGTGATCTGCTTATAGACTTGGG-3'
dTG63 Reverse	5'- AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC-3'

La composición de las reacciones y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Para una reacción TG328	
Reactivo	**Volumen (µL)**
ddH_2O	18,8
Buffer 10X	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	1,5
Primer F (10 µM)	0,5
Primer R (10 µM)	0,5
dNTP (10 mM)	0,5
TaqPol (5 U/ µL)	0,2
Muestra (20 ηg/ µL)	0,5
TOTAL	25

Ciclo de amplificación TG328		
1 ciclo	94°C	30 seg
35 ciclos	94°C	20 seg
	55°C	20 seg
	72°C	2 min
1 ciclo	72°C	7 min
Guardado	4°C	∞

El producto de amplificación esperado es en este caso una secuencia de 500 pb. Luego de la amplificación se realiza una digestión con la enzima *Bst*N1, que reconoce el sitio restricción 5'-G' CC'WGG-3'. La presencia del gen *Ph-3* está asociada con la presencia de este sitio de restricción.

4.3.3 Amplificación directa del gen Ph-3

Durante el desarrollo de este trabajo, un equipo de investigación en China descubrió la identidad del gen *Ph-3* de *S. pimpinellifolium* (Zhang *et al.* 2014). En la base de datos del GeneBank ya se encuentran depositadas tanto la secuencia genética (GeneBank: KJ563933) como la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente (GeneBank: AIB02970.1).

De acuerdo a Zhang *et al.* (2014), esta secuencia posee tres estructuras principales: una cola enrollada (CC), un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y una región rica en leucinas (LRR). De estas tres, la región LRR es la menos conservada al compararla con la de otras proteínas de resistencia a patógenos (63.3% de identidad contra 90.7 y 91.4% de CC y NBS respectivamente). Para minimizar la probabilidad de una amplificación no específica, se diseñaron cebadores en la zona de la LRR, por ser la más variable (Anexo 5). Así, se obtuvieron las siguientes secuencias:

Ph-3 Forward	5'-GGTGCGAAGGATTACATTCTACTC-3'
Ph-3 Reverse	5'- CGACAAGTTCATTTGCTCACTCG-3'

La composición de las reacciones y las condiciones de amplificación fueron las mismas que las usadas para el marcador TG328.

Para visualizar los productos de amplificación, se utilizaron geles de agarosa al 1.5%, y la separación de las bandas se produjo a un voltaje constante de 85 V durante 40 minutos.

4.3.4 Secuenciamiento de fragmentos amplificados con dTG63-M

Con la finalidad de analizar las secuencias que contienen al marcador dTG63, se secuenciaron las regiones sin digerir obtenidas por PCR con los cebadores dTG63-M (Anexo 3) a partir de 8 muestras de ADN, seis de las cuales pertenecían a individuos de cada una de las poblaciones estudiadas (Tabla 1), otra perteneciente a una variedad comercial de *S. lycopersicum* (Río Grande), y la última a una variedad mejorada de *S. lycopersicum*, resistente a varios patógenos, y que posee los genes *Ph-2* y *Ph-3* (Iron Lady)

Éstas muestras fueron purificadas utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de la purificación, los productos se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen Korea. Los resultados de este secuenciamiento fueron curados manualmente utilizando el programa BioEdit (v7.2.5) a partir de los electroferogramas recibidos. Por la naturaleza del secuenciamiento, las regiones más externas de la secuencia no presentaron una buena calidad, por lo que el tamaño curado fue menor al tamaño esperado de amplificación (~400 pb). Por ello, se decidió evaluar solo la región que en teoría debía ser aplificada por los cebadores dTG63

originales y que estaba contenida en las secuencias amplificadas con los primes dTG63-M (Anexos 3 y 4).

4.4 Análisis bioinformático de las regiones adyacentes a los marcadores dTG63 y TG328 y búsqueda de candidatos a genes de resistencia

4.4.1 Base de datos del genoma de S. pimpinellifolium

La secuencia del genoma de *S. pimpinellifolium* se encuentra disponible en la página de Sol Genomics Network (http://solgenomics.net) como "contigs" con secuencias parciales que deben ser ordenadas. Por ello, el análisis de regiones específicas del genoma requiere un paso previo de ordenamiento de las secuencias de los "contigs" involucrados.

4.4.2 Ordenamiento de regiones de 2 kilobases

Para determinar la identidad de posibles genes de resistencia ligados a los marcadores moleculares dTG63 y TG328 del genoma de *S. pimpinellifolium*, se inició el trabajo tomando como plantilla el genoma de *S. lycopersicum* para el ordenamiento de las secuencias de *S. pimpinellifolium*. Se trata de un genoma de referencia anotado, ordenado, curado constantemente y disponible en la red (https://solgenomics.net/). Una vez identificadas las regiones correspondientes a cada marcador en el genoma de *S. lycopersicum*, se consideraron 100 kilobases antes y 100 después del punto de amplificación del marcador para definir una secuencia con la que se hizo un BLAST contra la base entera de *S. pimpinellifolium*. Esto permite generar "scaffolds" (uniones de

secuencias genómicas no contiguas que se sobreponen entre sí) que tuvieron alineamiento con dicha secuencia fueron los que se ordenaron.

4.4.3 BLASTX

La herramienta de búsqueda BLASTx permite un análisis de las secuencias ordenadas a partir de los contig de Sol Genomics Network contra una base de datos de proteínas. Mediante este análisis se pueden identificar las proteínas cercanas a la zona del marcador molecular que se está evaluando, entre las cuales podrían estar las proteínas de resistencia codificadas por los genes de interés *Ph-2* o *Ph-3* u otras codificadas por otros genes de resistencia aún no descritos.

4.5 Análisis estadísticos

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para determinar si existían diferencias tanto en el área foliar afectada como en los niveles de esporulación entre las poblaciones de *S. pimpinellifolium* en los ensayos de resistencia a *P. infestans*. En casos en los que se detectó diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones por el ANOVA, se utilizó la corrección de Bonferroni para determinar qué tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre sí. Todos los análisis, además de las gráficas de caja-bigotes, se realizaron mediante el programa R (https://www.r-project.org/).

5. Resultados

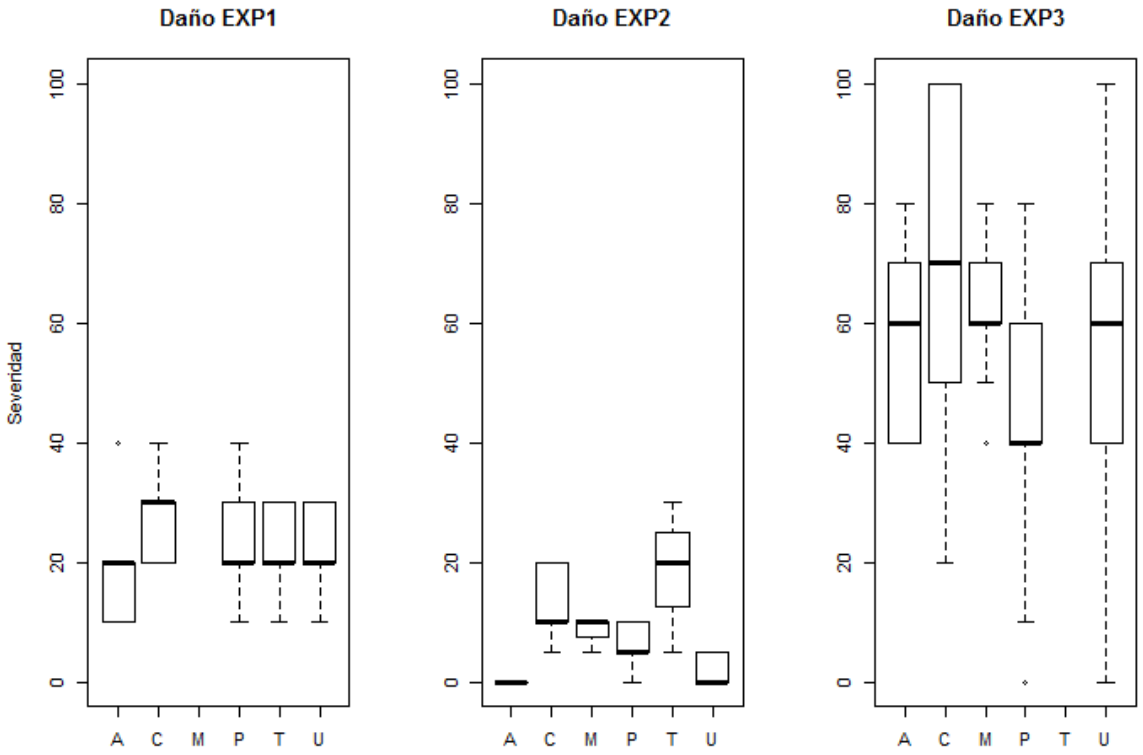
5.1 Ensayo de resistencia a *P. infestans*

Luego de realizada la inoculación de los foliolos por el método de Detached-Leaf en las distintas poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas, se obtuvo los resultados del porcentaje de área foliar afectada (severidad) y esporulación con los dos aislamientos de *Phytophthora infestans*, CIP638 y POX100. Los datos completos de todos los experimentos de inoculación con ambos aislamientos se encuentran en el Anexo 2.

5.1.1 Aislamiento CIP638

En la Figura 1 se puede observar la distribución de los datos de severidad en gráficas de caja y bigotes para las distintas poblaciones en los tres experimentos realizados. La concentración de esporangios de *P. infestans* CIP638 utilizada para estos experimentos fue de 1500 esporangios/mL.

Figura 1. Severidad de daño causado por el aislamiento CIP638 en cada población en los tres experimentos



Se debe señalar que no todas las poblaciones se pudieron analizar con la cantidad prevista de muestras en cada experimento. Es por esto que en el experimento 1, la población de Morante está ausente, mientras que la de Tambogrande lo está en el experimento 3. Por lo demás, se puede apreciar que el daño medido por severidad es bastante similar en todas las poblaciones para cada uno de los experimentos realizados. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre las poblaciones para cada experimento:

Experimento	Valor F	Probabilidad (p>0.05)
1	1.901	0.126
2	18.98	6.32×10^{-10}
3	2.028	0.109

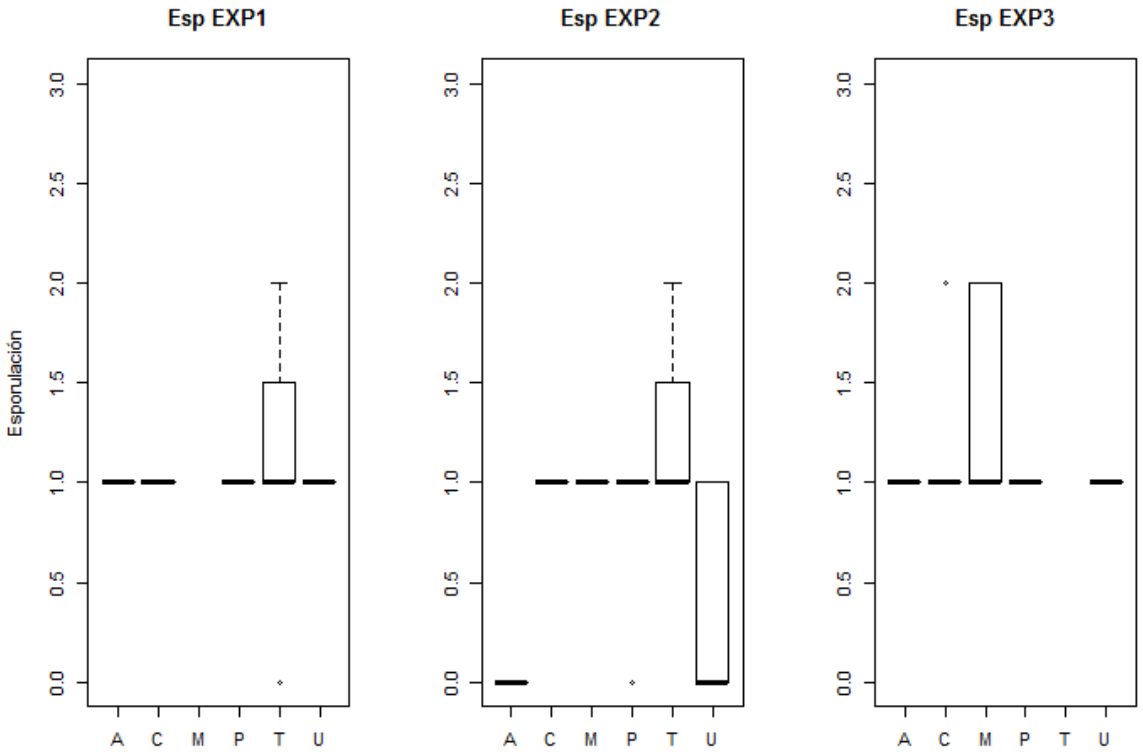
Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones en el experimento 2. Para determinar entre qué poblaciones dentro de este experimento se dan estas diferencias, se realizó un análisis post-ANOVA utilizando el test de Bonferroni:

	Azpitia	Colán	Morante	P. de Villa	Tambogrande
Colán	$1.7x10^{-7}$	-	-	-	-
Morante	0.06560	1	-	-	-
P. de Villa	0.01349	0.008	1	-	-
Tambogrande	$2.9x10^{-8}$	0.62344	0.04113	0.00013	-
UNALM	1	$1.2x10^{-5}$	0.36803	0.29558	$6.7x10^{-7}$

De acuerdo al análisis, las poblaciones de Tambogrande y Colán tuvieron los mayores grados de severidad, aunque Colán no se diferenció estadísticamente de la población de Morante; la población de Pantanos mostró una severidad intermedia que no se llegó a diferenciar estadísticamente de las severidades en las poblaciones de Morante y UNALM; y la población de Azpitia mostró los menores valores de severidad, pero tampoco se diferenció a nivel estadístico de las poblaciones de Morante y UNALM. Morante fue la población que menos se diferenció del resto de poblaciones, mostrando diferencias estadísticas solo con la población de Tambogrande. Si bien no hubo diferencias estadísticas entre los otros experimentos, se pudo apreciar en ellos una tendencia de la población de Colán a mostrar mayores niveles de severidad.

En los mismos experimentos realizados con este aislamiento de *P. infestans* se evaluó la esporulación, y la distribución de los datos en gráficas de caja y bigotes se presenta en la Figura 2:

Figura 2. Niveles de esporulación del aislamiento CIP638 en cada población en los tres experimentos



Debido al menor rango de valores en el que oscila la variable esporulación, los valores obtenidos en las distintas poblaciones se observan menos dispersos que los de severidad. Sin embargo, por la estrecha relación entre ambas variables, se notan tendencias parecidas en las poblaciones. Al realizar el ANOVA se obtuvieron los resultados siguientes:

Experimento	Valor F	Probabilidad (p>0.05)
1	0.799	0.532
2	17.95	$1.4x10^{-9}$
3	2.614	0.0508

Como se puede apreciar, es también el experimento 2 el que muestra diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones en cuanto a la esporulación. Una vez

más se realizó el test de Bonferroni para identificar las diferencias entre pares de poblaciones:

	Azpitia	Colán	Morante	P. de Villa	Tambogrande
Colán	$1.5x10^{-7}$	-	-	-	-
Morante	0.00026	1	-	-	-
P. de Villa	$1.6x10^{-6}$	1	1	-	-
Tambogrande	$4.4x10^{-7}$	1	1	0.44243	-
UNALM	0.34433	0.00101	0.04835	0.01472	0.00033

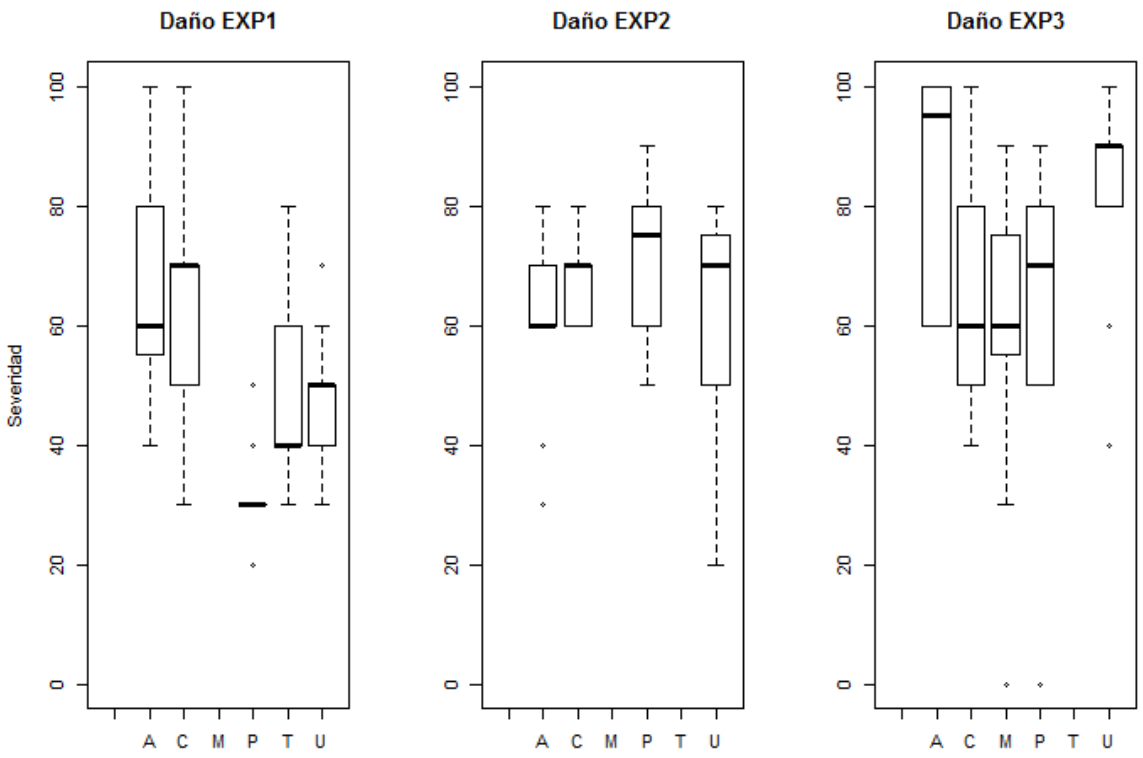
Las poblaciones que se diferenciaron estadísticamente del resto fueron Azptiia y UNALM, que mostraron los valores más bajos de esporulación. Sin embargo, al no observarse las diferencias en los otros 2 experimentos, ni tendencias en la misma dirección, es prudente considerar que se ha tratado de un resultado aislado.

En términos generales, y con la sola excepción de la población de Colán que tuvo una tendencia a mostrar mayores niveles de severidad, las poblaciones se comportaron de manera parecida en respuesta a la inoculación con este aislamiento de *P. infestans*.

5.1.2 Aislamiento POX100

En la Figura 3 se puede observar la distribución de los datos de severidad, siempre en gráficas de caja y bigotes, de los tres experimentos de inoculación realizados con este aislamiento de *P. infestans*. La concentración de esporangios utilizada para estos experimentos fue también de 1500 esporangios/mL.

Figura 3. Severidad de daño causado por el aislamiento POX100 en cada población en los tres experimentos



En términos generales, se puede observar que los niveles de severidad alcanzados con esta aislamiento de *P. infestans* en todas las poblaciones son mayores que los obtenidos con la aislamiento CIP638. No obstante, en este caso tampoco se hizo evidente una diferencia marcada entre cada población dentro de un mismo experimento. Para corroborar esta impresión se realizó un ANOVA:

Experimento	Valor F	Probabilidad (p>0.05)
1	15.96	1.21×10^{-9}
2	1.431	0.249
3	2.027	0.11

Solo se verificó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones en el experimento 1, pero no en los otros dos experimentos. Para examinar con mayor detalle las diferencias en este experimento se realizó el test de Bonferroni:

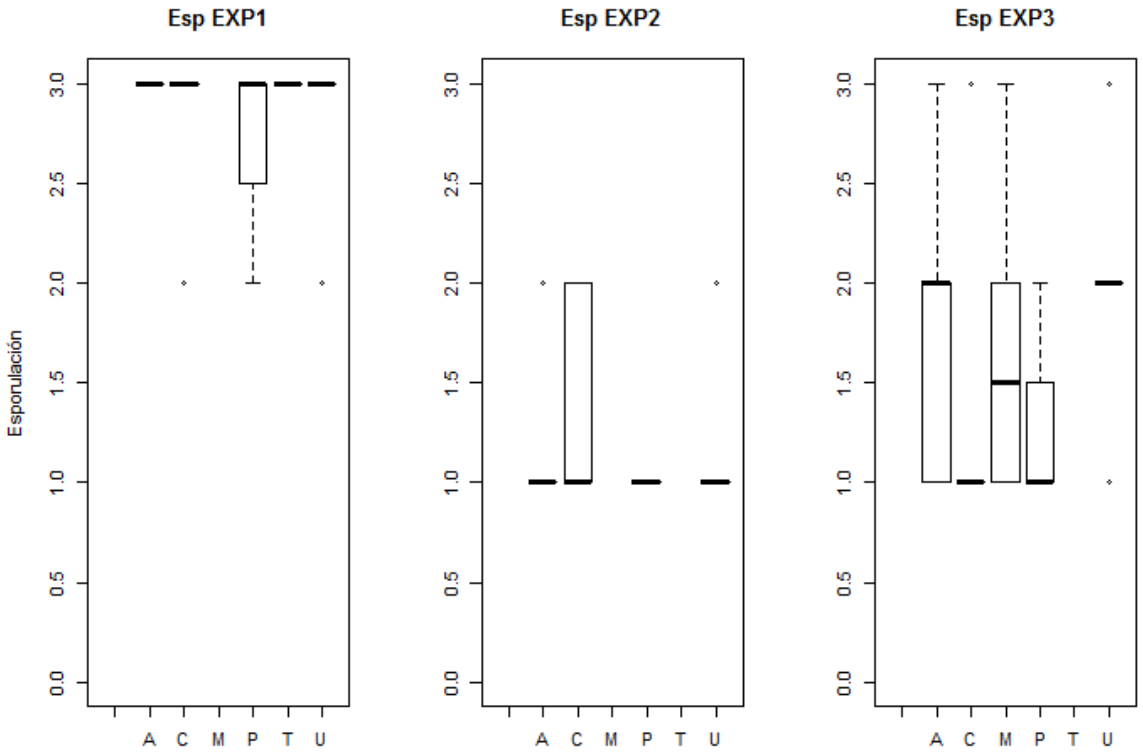
	Azpitia	Colán	P. de Villa	Tambogrande
Colán	1	-	-	-
P. de Villa	$1.5x10^{-8}$	$5.3x10^{-8}$	-	-
Tambogrande	0.0096	0.0233	0.0211	-
UNALM	0.0018	0.0047	0.0830	1

Las dos poblaciones con los valores más elevados de severidad fueron Azpitia y Colán, y difirieron de manera estadísticamente significativa del resto. Por otro lado, la población con el valor más bajo de severidad fue la de Pantanos de Villa, y ésta también se diferenció del resto de poblaciones, excepto por UNALM, que también presentó valores bajos.

A pesar de los claros contrastes entre poblaciones observados en este experimento, éstos no se repitieron en los otros dos experimentos y tampoco se pudo detectar una tendencia parecida.

Al evaluar la exporulación de *P. infestans* POX100 en esta serie de experimentos, se obtuvo las gráficas de distribución que se muestran en la Figura 4.

Figura 4. Niveles de esporulación del aislamiento POX100 en cada población en los tres experimentos



Como en el caso de la severidad, se notó un claro incremento en el valor de esporulación en las diferentes poblaciones con respecto a los experimentos realizados con el aislamiento CIP638. Para determinar si existían diferencias entre poblaciones en los experimentos se realizó un ANOVA:

Experimento	Valor F	Probabilidad (p>0.05)
1	2.873	0.0281
2	1.994	0.131
3	2.27	0.0802

Como en el caso de la esporulación, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones en el experimento 1. Para determinar entre qué poblaciones se daban las diferencias, se utilizó el test de Bonferroni:

	Azpitia	Colán	P. de Villa	Tambogrande
Colán	1	-	-	-
P. de Villa	0.042	0.190	-	-
Tambogrande	1	1	0.072	-
UNALM	1	1	1	1

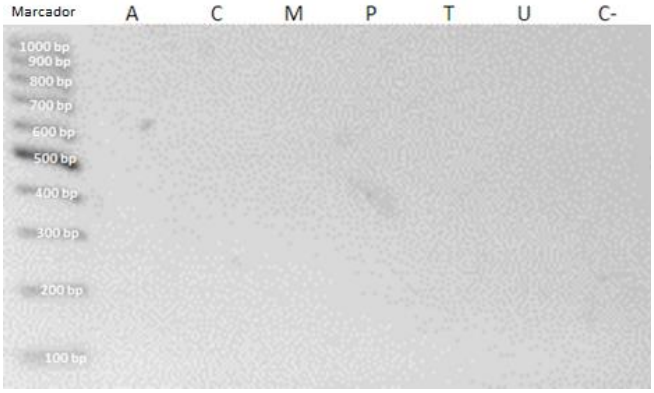
Aunque no resulta evidente a partir de la gráfica, la diferencia solo ocurrió entre las poblaciones de Azpitia y Pantanos de Villa, siendo esta última la que mostró valores estadísticamente menores en la esporulación. Aun así, estos mismos resultados no se repitieron en los otros dos experimentos, si bien en el experimento 3 se observó una tendencia similar en la población de Pantanos de Villa que no llegó a tener significación estadística.

5.2 Análisis molecular

Para determinar la presencia de los genes *Ph-2* y *Ph-3* se utilizaron marcadores del tipo CAPS reportados en la literatura. El cebador marcador que se evaluó fue el dTG63, desarrollado por Martha Mutschler (Universidad de Cornell) para determinar la presencia del gen *Ph-2*. Este marcador debía amplificar una región de 246 pb, con un sitio de corte para la enzima *HinfI* (5'-G'ANTC-3') en caso el gen estuviese ausente. La digestión debería generar un fragmento de 221 pb y otro de 25 pb. Al realizar la amplificación por PCR para la detección de dTG63 de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y Métodos no se

obtuvo amplificación con ninguna de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudadas, tal como se aprecia en la Figura 5.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del marcador dTG63 para las distintas poblaciones de *Solanum pimpinellifolium*

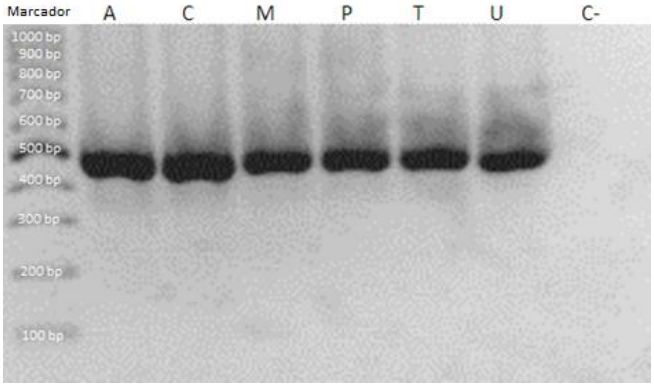


Gel de agarosa al 1%, 85 V durante 40 minutos con un marcador de 100 pb. En cada carril se cargó un volumen de 10 µL de producto de PCR (A: Azpitia; C: Colán; M: Morante; P: Pantanos de Villa; T: Tambogrande; U: UNALM; C-: *S. lycopersicum*)

En otro experimento independiente tampoco se logró obtener amplificación a partir de ADN de especímenes de *S. lycopersicum*, a pesar de que la región de amplificación y el sitio de restricción *Hinf*I debían estar presentes.

El segundo marcador a evaluar fue el TG328 (Robbins *et al.* 2010), que sirve para determinar la presencia del gen *Ph-3*. Este marcador amplifica una región de 500 pb, con un sitio de restricción *Bst*N1 (5'-CC'WGG-3') en caso el gen *Ph-3* estuviese presente. La secuencia se corta en un fragmento de 260 pb y otro de 240. Tal como se observa en la Figura 6, el marcador TG328 fue amplificado sin mayores dificultades y el tamaño del fragmento correspondió al esperado de 500 pb.

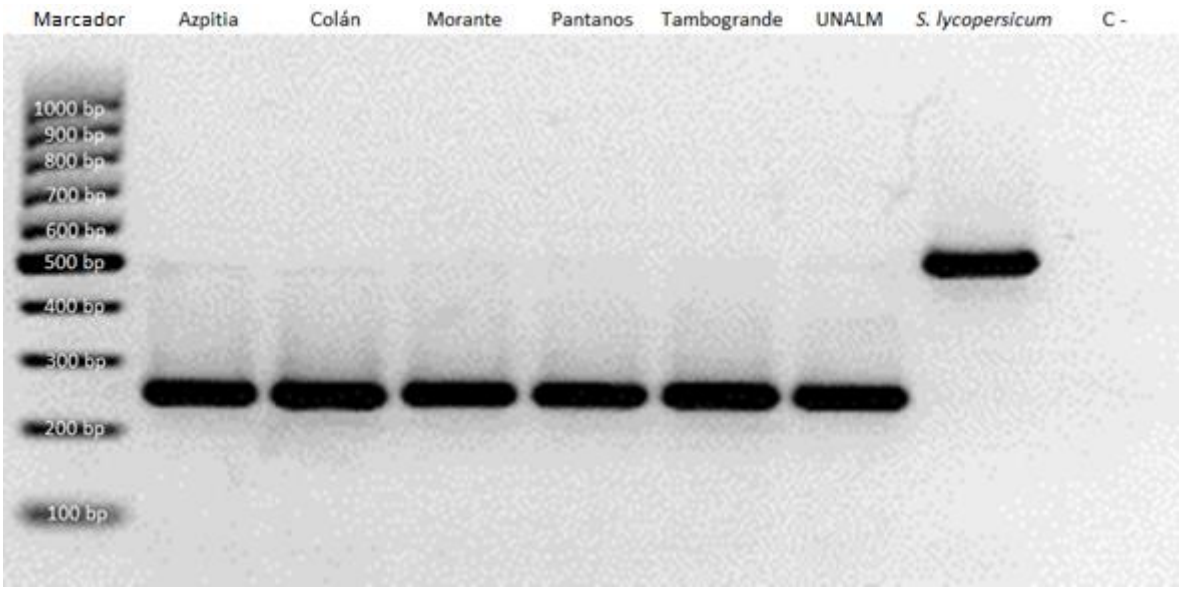
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del marcador TG328 para las distintas poblaciones de *Solanum pimpinellifolium*



Gel de agarosa al 1%, 85 V durante 40 minutos con un marcador de 100 pb. En cada carril se cargó un volumen de 10 µL de producto de PCR (A: Azpitia; C: Colán; M: Morante; P: Pantanos de Villa; T: Tambogrande; U: UNALM; C-: *S. lycopersicum*)

Luego de hacer la digestión con la enzima de restricción *Bst*N1, el producto de amplificación obtenido con todas las poblaciones fue cortado en 2 fragmentos de los tamaños esperados (Figura 7), lo que indica la presencia del gen *Ph-3* en todas ellas. Por otro lado, y de acuerdo a lo anticipado, no se observó corte alguno en el producto de amplificación obtenido a partir de *S. lycopersicum*, lo que indica ausencia del gen. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado en la literatura científica según la cual este gen, detectado originalmente en una accesión de *S. pimpinellifolium* (Moreau *et al.* 1998), está ausente en plantas de tomate comercial.

Figura 7. Amplificación del marcador CAPS TG328 y corte enzimático con la enzima *Bst*N1



Gel de agarosa al 1.5%, 85 V durante 40 minutos con un marcador de 100 pb.
En cada carril se cargó un volumen de 10 µL de producto de PCR.

Los resultados fueron confirmados por la amplificación directa del gen *Ph-3* con los cebadores diseñados en base a la secuencia reportada por Zhang *et al.* (2014).

5.3 Análisis bioinformático

Para realizar el análisis bioinformático, se identificaron primero las secuencias de las regiones amplificadas *in silico* por los cebadores de los marcadores dTG63 y TG328 en el genoma de *S. pimpinellifolium*, almacenado en la bases de datos de Sol Genomics Network (www.solgenomics.net).

Debido al tamaño reducido de los cebadores, no se pudo realizar un BLAST de sus secuencias usando las herramientas de ésta página, lo que hizo necesario generar

secuencias más grandes. Se aprovechó que las secuencias de anclaje de los cebadores se encuentran también en el genoma de *S. lycopersicum*, ya ordenado y anotado, para generar una secuencia patrón que sirviese de herramienta para buscar la secuencia luego en el genoma de *S. pimpinellifolium*.

Los cebadores de dTG63 amplificaron la región contenida entre las posiciones 64096456 a 64096701 del cromosoma 10 de *S. lycopersicum*. La secuencia es la siguiente:

```
>dTG63
CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTGAGTTGGGATGG
AAAGAATGCAACATAATGTCGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATTATCAACTTTGTTTTTCCATGATGCATAATCT
AAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGACACTATTTCCCTAATAGTATGTTCCAAAAAGAA
CGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
```

Por otro lado, los cebadores de TG328 amplificaron la región contenida entre las posiciones 66713066 a 66713561 del cromosoma 9 de *S. lycopersicum*. La secuencia es la siguiente:

```
>TG328
GGTGATCTGCTTATAGACTTGGGGAATCTTCCCCTCGACCCCTCACGAGCTAGCTTTTGGGGTTGCATATCAT
TGTCCAGCTAACCAAACTAAACTATATGTATTTAAACCATATATGAAGTATACCTTATGGGAAATTTGAAGGA
ATGAAGGTTATTACTAGTATGTTAAACTCATGCTTATGTAACTTTGAGCATTAACACATAAAAAGGGGCAGCG
CGGTGCACTATATTCTCCGGCTATAACTAGGGACATTGAACTTGCATTTTTGCGAGAGACTATTTAAATGGCT
AGAGACAAAGGCACGTTGCCATAATGGACATAAATTAACGACTATATACAAAGTTAGCCATGTGTCACGATTC
TCTGAATACAAAAGTCTGGTATTTAAGGGGAGAAAGATGCAAGCCTATTATTCATCGAGTTTTTGAATCATAG
CGCGAGAAAAAGAATAAACCTGCTCTTTTTCCATTTGCACCAGCCTTCTTTAGACCTT
```

Para obtener una secuencia patrón que abarcara las zonas cercanas al sitio de amplificación y que permitiese la búsqueda de genes de resitencia potenciales ligados a

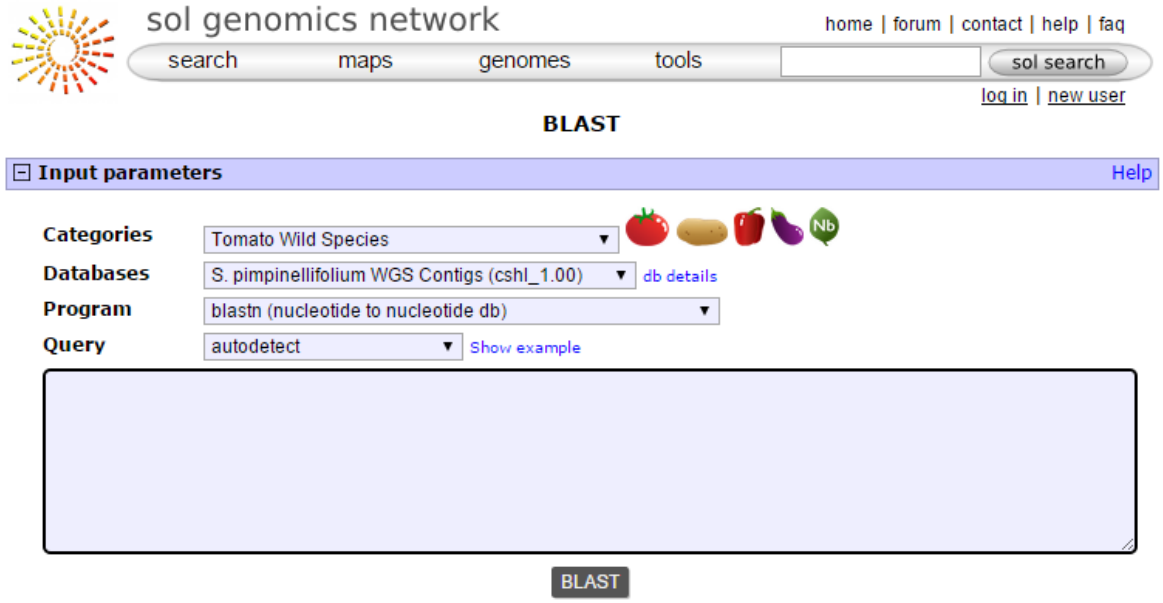
los marcadores, se decidió tomar 100 kilobases a cada lado de las secuencias amplificadas, obteniéndose en cada caso una secuencia patrón de aproximadamente 200 kilobases.

Las secuencias que se extrajeron fueron las siguientes:

Secuencia	Cromosoma	Desde	Hasta
200kb-dTG63	10	63996456	64196701
200kb-TG328	9	66613066	66813561

Una vez extraída la secuencia, se identificaron los contigs del genoma de *S. pimpinellifolium* que se alineaban a lo largo de las secuencias patrón. Para esto, se utilizó el programa BLAST implementado en la página-web www.solgenomics.net (Imagen 8).

Imagen 8. Interface de BLAST de Sol Genomics Network para la especie *Solanum pimpinellifolium*



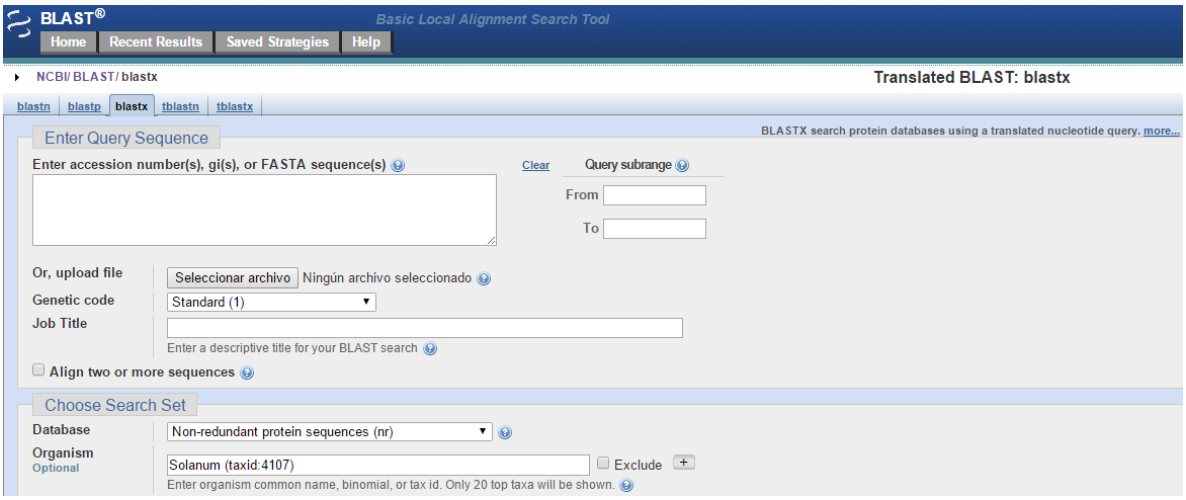
Debido al gran tamaño de las secuencias buscadas (≈200 kb), se encontraron alrededor de 90 secuencias que coincidían (en la actualidad solo coinciden 20 secuencias por haberse actualizado y curado los datos).

Los contigs encontrados se ordenaron y alinearon en un solo archivo para cada caso:

Archivo	Descripción
dTG63-O	Marcador dTG63 + 100 kb hacia la derecha e izquierda
TG328-O	Marcador TG328 + 100 kb hacia la derecha e izquierda

Estos archivos fueron utilizados en el programa Blastx del NCBI (Imagen 9) para determinar qué proteínas del tipo R, o potenciales proteínas de este tipo, podrían estar ligadas a las regiones de los marcadores reportados.

Imagen 9. Interface de BLASTX del NCBI para el género *Solanum*



Mediante esta aproximación se encontraron las proteínas candidatas siguientes:

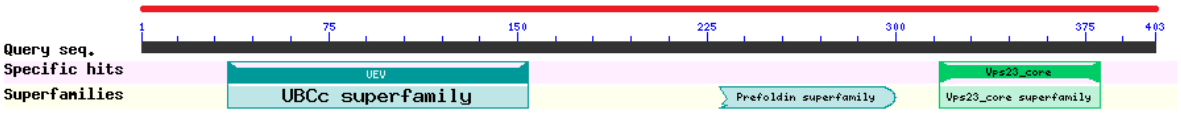
5.3.1 En dTG63-O:

Cuatro proteínas. Las líneas rojas muestran las extensiones de las proteínas predichas que están incluidas en dTG63-O.

1.	**Nombre:**	PREDICTED: protein ELC-like [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_010312317.1
	Familia representativa:	Superfamilia UBCc

Esta proteína se encuentra presente de forma completa en la región ordenada. Posee una región de la superfamilia UBCc (Ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic (UBCc) domain), la que, en plantas está asociada a regulación por degradación (Mazzucotelli *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen referencias directas de su participación en mecanismos de resistencia en solanáceas o contra *P. infestans* (Imagen 10).

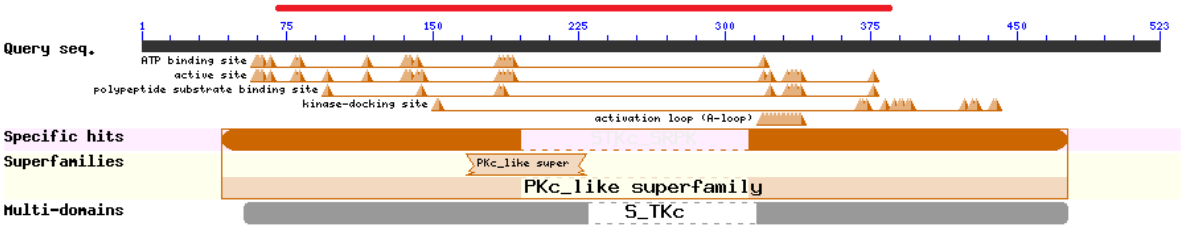
Imagen 10. Predicción de familias presentes en la proteína hipotética XP_010312317.1



2.	**Nombre:**	PREDICTED: SRSF protein kinase 2-like [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_004249591.1
	Familia representativa:	Superfamilia PKc

Esta proteína tiene un tamaño de 523 aminoácidos de los que solo una parte, del 73 al 386, está presente en dTG63-O. Esta región contiene dominios catalíticos del tipo serin/treonin quinasa, (Imagen 11). Las proteínas de este tipo están involucradas en procesos de resistencia a patógenos como *Pseudomonas* en plantas (Swiderski & Innes, 2001; Zhang *et al.*, 2010), y además pueden funcionar como reguladores para proteínas de tipo NBS-LRR, también involucradas en procesos de resistencia en plantas (DeYoung *et al.*, 2012).

Imagen 11. Predicción de famlias presentes en la proteína hipotética XP_004249591.1

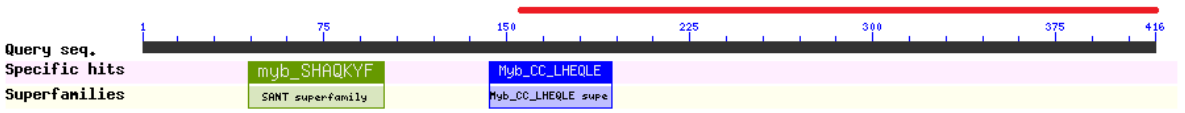


3.	**Nombre:**	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101256236 isoform X1 [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_010312321.1
	Familia representativa:	Superfamilia SANT, Myb-CC-LHEQLE

Esta proteína tiene 416 aminoácidos, de los que sólo están presentes en dTG63-O los comprendidos en la secuencia que va del aminoácido 160 al 416. La proteína tiene dominios de unión a ADN del tipo Myb, ligados a procesos de metabolismo (Rose *et al.*, 1999), respuesta a inanición (Rubio *et al.*, 2001) y desarrollo (Yasumura *et al.*, 2005), pero no directamente a resistencia contra patógenos. Además, estos dominios se encuentran

en la región que no está presente en dTG63-O (del aminoácido 1 al 159), por lo que definitivamente habría perdido esa función en *S. pimpinellifolium* (Imagen 12).

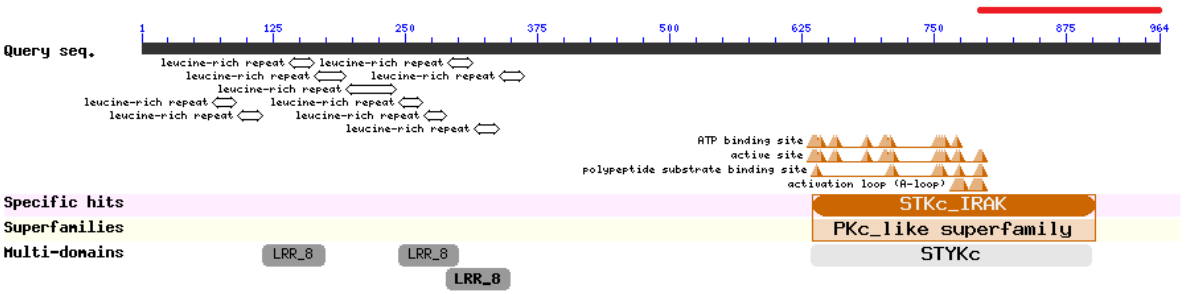
Imagen 12. Predicción de familias presentes en la proteína hipotética XP_010312321.1



4.		
	Nombre:	PREDICTED: probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g49770 [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_004249557.1
	Familia representativa:	Superfamilia PKc, LRR

Esta proteína tiene 964 aminoácidos, de los que solo están presentes los últimos 169 (795-964). La proteína completa tiene dominios característicos de los genes de resistencia en plantas (Imagen 13), pero el fragmento presente en dTG63-O no posee ninguno de los dominios ricos en leucinas (LRR), sitios de unión a ADN (NBS) o sitios con actividad serin/treonin quinasa, importantes para la función de los genes R (Warren *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2000; Tameling *et al.*, 2002; McHale *et al.*, 2006; Lozano *et al.*, 2012; Andolfo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Imagen 13. Predicción de familias presentes en la proteína hipotética XP_004249557.1



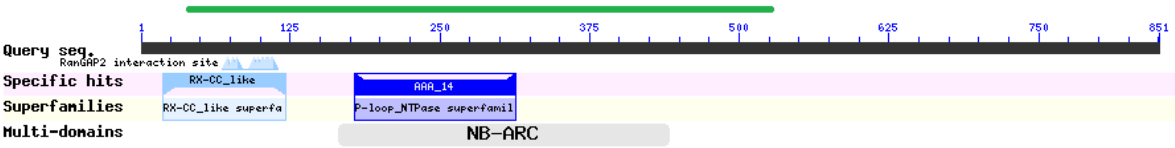
5.3.2 *En TG328-O:*

Cuatro proteínas. Las líneas verdes muestran las extensiones de las proteínas predichas que están incluidas en TG328-O.

1.	**Nombre:**	Ph-3 resistance protein [Solanum pimpinellifolium]
	Código:	AIB02970.1
	Familia representativa:	LRR-NBS-CC

Esta proteína ha sido recientemente descrita por Zhang *et al.*, (2014) en *Solanum pimpinellifolium*. En sus 851 aminoácidos de longitud, posee un dominio de cola enrollada (CC), un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y dominios ricos en leucina (LRR) (Anexo 6). Es importante notar que esta proteína no se encuentra completa en TG328-O, región que ha sido ordenada directamente de los contig dados por Sol Genomics Network para esta especie. Solo se encuentra desde el aminoácido 40 hasta el aminoácido 526, porción de la proteína que contiene los dominios importantes descritos (Imagen 14).

Imagen 14. Familias presentes en la proteína Ph-3

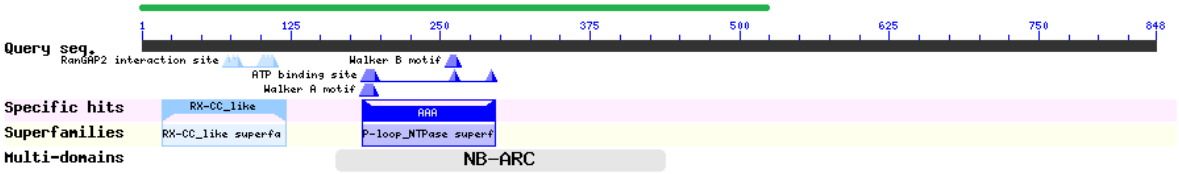


2.	**Nombre:**	PREDICTED: disease resistance protein RPP13-like [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_004247879.1
	Familia representativa:	LRR-NBS-CC

Esta proteína es muy parecida a Ph-3, pero tiene algunos aminoácidos distintos en el dominio CC. En su forma completa tiene 848 aminoácidos pero, al igual que en el caso de

Ph-3, la proteína solo se encuentra desde el aminoácido 1 hasta el 523 (Imagen 15). Esta proteína se encuentra en una región distinta a la que ocupa Ph-3 en TG328-O.

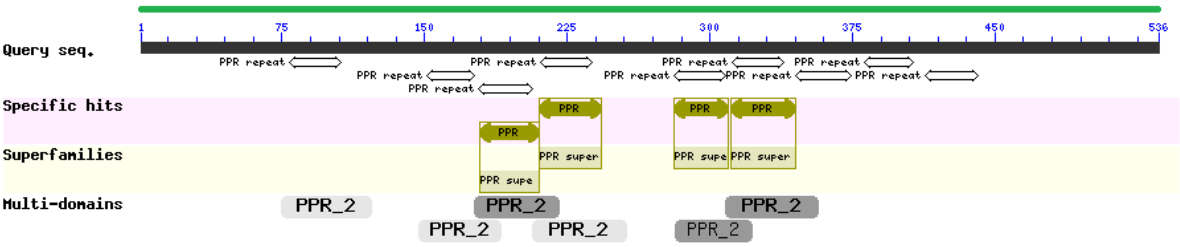
Imagen 15. Predicción de familias presentes en la proteína hipotética XP_004247879.1



3.		
	Nombre:	PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At2g20540 [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_004247963.2
	Familia representativa:	Superfamilia PRR

Esta proteína se encuentra completa en TG328-O. Posee 536 aminoácidos y dominios de tipo PPR, dominio de repetición pentatricopéptido (Imagen 16). Estas regiones no tienen una función conocida, pero se les asocia con la unión a mRNA y otras proteínas (O'Toole *et al.*, 2008), por lo que se asume pueden jugar un papel importante en la regulación (Geddy & Brown, 2007; Dahan & Mireau, 2013; Small & Peeters, 2000).

Imagen 16. Predicción de familias presentes en la proteína hipotética XP_004247963.2



4.		
	Nombre:	PREDICTED: stress response protein NST1-like [Solanum lycopersicum]
	Código:	XP_010326854.1
	Familia representativa:	Superfamilia SANT

Esta proteína completa tiene un tamaño de 440 aminoácidos, pero se encuentra solo en un 50% de su secuencia en TG328-O (1 hasta 253), incluyendo el dominio de unión a ADN Myb (Imagen 17). Como se mencionó anteriormente, este dominio está relacionado a respuesta a inanición (Rubio *et al.*, 2001). Las proteínas NST1, NST2 y NST3 están asociadas con la regulación en crecimiento de plantas (Mitsuda *et al.*, 2005; Mitsuda & Ohme-Takagi, 2008), pero no existen registros para "NST1-like" como la encontrada en TG328-O.

Imagen 17. Predicción de familias presentes en la proteína hipotética XP_010326854.1

6. Discusión

Para investigar la diversidad de respuestas del tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* al patógeno *Phytophthora infestans*, se evaluó la resistencia/susceptibilidad de seis poblaciones peruanas de esta especie de tomate provenientes de Piura y Lima, dos regiones con características climáticas y geográficas distintas (Caicedo, 2008; Zuriaga *et al.*, 2009). La evaluación se determinó de manera experimental con dos aislamientos de *P. infestans* obtenidos en el Perú y que pertenecen a la raza EC-1, la de mayor prevalencia en el país (Pérez *et al.*, 2001). Además, se exploró si los resultados experimentales guardaban

alguna relación con la presencia o ausencia de los genes de resistencia de tomate *Ph-2* y *Ph-3*, reportados en la literatura científica como elementos que contribuyen a la resistencia del tomate a distintos aislamientos de *P. infestans* (Moreau *et al.*, 1998; Brusca, 2003; Foolad *et al.*, 2008). Por último, se hizo un ejercicio bioinformático con el genoma de *S. pimpinellifolium*, liberado recientemente en http://solgenomics.net/ para analizar las secuencias en las proximidades de los marcadores moleculares de *Ph-2* y *Ph-3* e intentar ubicar estos genes, así como identificar otros potencialmente involucrados en la respuesta de defensa de la planta a patógenos.

El ensayo de resistencia/susceptibilidad por inoculación de tipo "Detached-Leaf" permite estimar, en experimentos a escala pequeña, la respuesta que la planta puede tener ante el ataque de un patógeno (Vleeshouwers *et al.*, 1999). Si bien la estimación puede verse limitada debido a que las condiciones de crecimiento de las plantas (cuarto de cultivo, tinglado) son distintas a las que ocurren en el campo, y que el desprendimiento de la hoja de la planta para realizar el ensayo puede acarrear procesos fisiológicos y bioquímicos que alteren las capacidades de respuesta de la misma, el ensayo sigue utilizándose como una aproximación confiable para una primera evaluación de barrido (Nowakowska *et al.*, 2014). Se siguió la recomendación de realizar el ensayo al menos 3 veces para obtener valores representativos en los dos parámetros evaluados, área de la hoja infectada (severidad) y cantidad de esporas producidas (esporulación) (Pérez & Forbes, 2008; Forbes *et al.*, 2014).

A la luz de los resultados obtenidos, no puede afirmarse que existan diferencias estadísticamente significativas en la resistencia/susceptibilidad de las seis poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas a los dos aislamientos de *P. infestans* utilizados. Hubo, no obstante, una cierta tendencia en los diferentes experimentos que sugiere que la población de Pantanos de Villa sufrió un menor daño por el patógeno, lo que debiera ser examinado en experimentos futuros de inoculación de plantas enteras.

Debe señalarse que, más allá de seguirse recomendaciones tales como prescindir de plaguicidas, fungicidas o algún tipo de nutriente adicional para minimizar las variaciones entre ensayos, hubo diferencias marcadas en los resultados obtenidos en los parámetros de severidad y esporulación para una misma población enfrentada a un aislamiento del patógeno. Entre las explicaciones probables de este fenómeno está el hecho de que las condiciones ambientales no fueron las mismas a lo largo de todas las etapas de crecimiento de las plantas al realizarse la repetición de los ensayos. Éstas se encuentran bajo condiciones uniformes de temperatura durante la germinación y crecimiento en almácigos en el cuarto de cultivo, pero en la etapa posterior de crecimiento en el tinglado están más expuestas a las variaciones del clima. Los experimentos se llevaron a cabo entre los años 2012 y 2014, en los meses de junio y julio, y una serie de registros al azar durante el período de crecimiento en el tinglado permitieron detectar oscilaciones en las temperaturas máximas entre los 24°C y 29°C y en las mínimas entre los 14°C y 19°C. Estas diferencias climáticas durante el desarrollo de las plantas podrían haber influido en la respuesta de los foliolos a la inoculación con el patógeno.

A pesar de la variabilidad observada en un experimento a otro, sí se encontraron diferencias significativas en los niveles de severidad y esporulación observados en cada población de *S. pimpinellifolium* según el aislamiento de *P. infestans* utilizado. De ellos, POX100, colectado en campos de tomate infectados en la localidad de Oxapampa de la región Pasco, mostró una mayor agresividad, que se reflejó en las áreas afectadas más extensas en los foliolos inoculados y mayores grados de esporulación que los provocados por el aislamiento CIP638, originario de la región Ica. Estas diferencias en la agresividad de ambos aislamientos se han dado a pesar de haber sido mantenidos bajo las mismas condiciones, y activados de la misma manera.

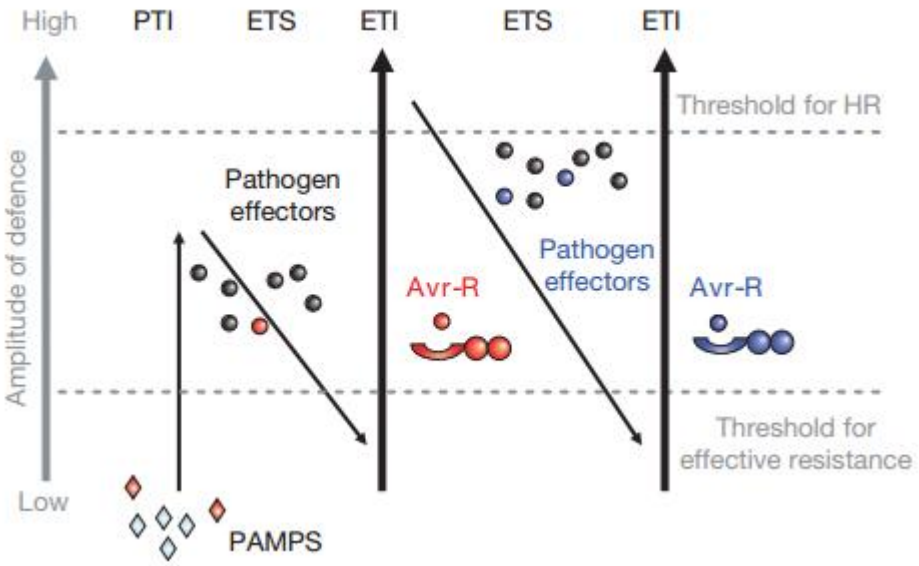
Es necesario resaltar que es escasa la información sobre *P. infestans* en campos cultivados con tomate en el Perú. La poca información que se tiene sobre el patógeno está mayormente referida a papa, especie en la que *P. infestans* se describió originalmente y que se cultiva en mayor extensión que el tomate (Pérez & Forbes, 2008). En cuanto a los resultados obtenidos, éstos podrían reflejar las diferencias en los sitios de colecta del patógeno, así como las condiciones bajo las cuales la especie *S. pimpinellifolium* crece en su hábitat natural. Por un lado, Oxapampa es una zona ubicada en un valle cercano a bosques y amplia vegetación, con precipitaciones promedio anuales de 1411 mm/m^2, mientras que Ica, ubicada también en un valle, está en medio del desierto del Pacífico, con precipitaciones promedio anuales de solo 8 mm/m^2 (SENAMHI). Las características climáticas de Oxapampa son favorables para el crecimiento y desarrollo del patógeno *P. infestans* (Fry, 2008), por lo que el aislamiento de la región Oxapampa podría haber

pasado por un proceso evolutivo más rico, y por ende, haber dado lugar a la aparición de aislamientos de mayor agresividad en comparación a los aislamientos de Ica. Por otro lado, si bien *S. pimpinellifolium* se distribuye en una diversidad de condiciones ambientales desde Ecuador, pasando por Piura (al área de mayor diversidad genética) hacia el sur por toda la costa peruana, los niveles de humedad a los que está expuesta esta especie silvestre de tomate son bastante menores que los existentes en Oxapampa, que forma parte del bosque húmedo de montaña. Este hecho podría determinar que las plantas de esta especie estén mejor constituidas para enfrentar patógenos que han evolucionado bajo características ambientales similares. Por último, por el tipo de agricultura que se practica en ambas regiones (más de tipo minifundio en Oxapampa, más extensiva en Ica), *P. infestans* podría verse menos expuesto a un control sistemático en base a plaguicidas en Oxapampa, y con ello haber tenido la oportunidad de seguir con un proceso evolutivo más completo a través de su interacción con solanáceas cultivadas en la zona. De ser así, el aislamiento de Ica podría mostrarse menos agresivo en comparación con el de Oxapampa, con el que probablemente no haya podido tener contacto aún por barreras geográficas. Estas posibles explicaciones, además, no son mutualmente excluyentes, por lo que podría haber una combinación de factores influyentes.

Las plantas han desarrollado dos estrategias para detectar patógenos: (1) el reconocimiento directo a través de receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP); y (2) el reconocimiento directo o indirecto, por lo general a nivel intracelular, mediado por proteínas codificadas por los genes de resistencia (*R*), que son

en su mayoría proteínas con un dominio de unión a nucleótidos (NB) y un dominio de secuencias repetidas ricas en leucina (LRR) (Jones & Dangl, 2006; Hein *et al.*, 2009; Marone *et al.*, 2013)

Imagen 18. Esquema zig-zag del modelo co-evolutivo planta-patógeno



PTI= PAMP-triggered immunity, ETS= Effector-triggered susceptibility, ETI= Effector-triggered immunity

Jones & Dangl, 2006

La relación entre estos dos mecanismos se muestra en la Imagen 18. En una primera instancia la planta reconoce al patógeno potencial a través de los PAMPs, lo que conduce a la llamada inmunidad desencadenada por patógenos (PTI). El patógeno puede superar este nivel de defensa al producir efectores (ETS) que interfieren con PTI, dando lugar a un escenario de susceptibilidad. Las plantas pueden a su vez adquirir genes que les permitan contrarrestar la acción de los ETS vía la síntesis de proteínas R, las que reconocen de manera "específica" a estos efectores y generan una inmunidad desencadenada por

efectores (ETS). Este ciclo co-evolutivo puede repetirse de manera ilimitada, apareciendo nuevos efectores y luego nuevas proteínas R que los neutralizan.

El oomiceto *P. infestans* se origina en Méjico (Goss *et al.*, 2014), país en el que existen regiones como el Valle de Toluca, cuyas condiciones de temperatura y precipitación durante la temporada de crecimiento de las plantas son ideales para el desarrollo de la enfermedad (Grünwald *et al.*, 2001). En la actualidad el patógeno está ampliamente distribuido, habiéndose realizado diversos estudios para caracterizar las razas de *P. infestans* presentes en diferentes países, entre ellos el Perú. Tooley *et al*. (1989) evaluaron diferentes aislamientos de *P. infestans* en nuestro país, y al compararlos con otros obtenidos en Méjico, E.E.U.U. y Europa, encontraron una menor diversidad fenotípica en los aislamientos peruanos. La pequeña variabilidad detectada en el Perú podría deberse a una hibridación ocurrida, luego de un evento de migración global del patógeno, entre estas últimas poblaciones con poblaciones previamente establecidas en nuestro país a través de eventos migratorios independientes (Goss *et al.*, 2014). Hoy en día se sabe que la raza dominante en nuestro país es la EC-1, algo que ha cambiado desde las décadas de los 80 y 90 en las que la raza US-1 era la dominante. Asimismo, no se han registrado datos de presencia de tipo A2 en el Perú, por lo menos hasta inicios del presente siglo (Pérez *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en los ensayos de tipo “Detached-Leaf” mostraron, más allá de las diferencias ya señaladas entre los aislamientos utilizados en el presente estudio, una

agresividad significativa del patógeno en todas las poblaciones locales de *S. pimpinellifolium* examinadas. Al respecto, existen factores que podrían explicar este comportamiento: el primero es que las razas que antes eran especie-específicas (e.g. para papa), habrían roto esta barrera y ahora infectarían otras solanáceas (Garry *et al.*, 2005), algo que ha sido observado en Méjico y E.E.U.U. (Mayton *et al.*, 2000); por otro lado, en el transcurso de los últimos 15 años podría haber llegado el tipo A2 al Perú, y al reproducirse, generar razas del patógeno más agresivas. Estas explicaciones hipotéticas deberán ser confirmadas o descartadas en estudios futuros.

Como en el caso de otros sistemas planta-patógeno, la relación co-evolutiva entre *S. pimpinellifolium* y *P. infestans* obedece al esquema de relación hospedero-patógeno descrito en la Imagen 18 (Jones & Dangl, 2006). *S. pimpinellifolium* es una especie silvestre de tomate que posee varios genes de tipo *R*, entre ellos un grupo relacionado a la resistencia a *P. infestans* (Dale, 2006; Sharma *et al.*, 2008; Andolfo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). De hecho, varios de los genes de resistencia a *P. infestans* (*Ph*), entre ellos los genes *Ph-2* y *Ph-3*, han sido descubiertos en accesiones de *S. pimpinellifolium* que se encuentran en repositorios internacionales, y por ello se anticipaba que las poblaciones evaluadas en este trabajo pudiesen presentar estos genes.

El gen *Ph-3* fue descrito por primera vez por (Black et al. 1996) y ha sido motivo de estudio en diversos grupos de investigación durante la primera década de este siglo debido a que otorga una buena resistencia contra diversos aislamientos de *P. infestans* que atacan los

cultivos de tomate (Park *et al.*, 2010; Foolad & Panthee, 2012; Panthee *et al.*, 2015). El marcador TG328 diseñado por Robbins *et al.* (2010) permitieron determinar, como parte de este estudio, la presencia del gen en todas las poblaciones de *S. pimpinellifolium* analizadas y su ausencia en plantas de *S. lycopersicum*. Durante el desarrollo del presente trabajo, un grupo de investigación chino utilizó una serie de marcadores moleculares para un mapeo fino del gen *Ph-3* que culminó en su ubicación en el genoma y la revelación de su secuencia completa, así como la de su producto, una proteína del tipo CC-NBS-LRR (Zhang *et al.*, 2014). A la fecha, este es el único gen de resistencia contra *P. infestans* que ha sido identificado y secuenciado en *S. pimpinellifolium*, lo que permitió el diseño de un par de cebadores para la detección directa del gen (Anexo 6). Mediante el uso de estos cebadores, *Ph-3* pudo ser detectado de forma inequívoca en todas las poblaciones de *S. pimpinellifolium* locales analizadas como parte de este trabajo.

En cuanto al gen *Ph-2*, los cebadores para el marcador CAPS dTG63 descritos por M. Mustchler (comunicación personal) debían permitir la amplificación de un fragmento de 246 pb. Sin embargo, el marcador CAPS dTG63 no pudo ser amplificado por PCR en ninguna de las muestras en los ensayos realizados como parte de este estudio. Un análisis bioinformático a partir de las secuencias reportadas de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* (The Tomato Genome Consortium, 2012) permitió detectar una mutación (T→A) en el sitio de anclaje del cebador “reverse”. Se decidió generar cebadores para amplificar una región más extensa del genoma que incluyese el marcador CAPS dTG63 en todas las poblaciones de tomate silvestre y cultivable utilizadas en este estudio, y al

secuenciar los productos de amplificación se constató que esta misma mutación puntual aparecía en todas las secuencias analizadas. Este último análisis no permitió detectar el sitio de corte para la enzima de restricción *Hinf*I dentro de la región amplificada por los cebadores para el marcador CAPS dTG63 en variedades de tomate cultivable (*S. lycopersicum*), lo que debía ocurrir, excepto en el caso de la variedad Iron Lady (ver abajo), por no presentar estas variedades el gen (Moreau *et al.*, 1998). En estos casos la enzima de restricción *Hinf*I debiera cortar el producto de amplificación en dos fragmentos de 221 y 25 pb. Más bien, la amplificación extensa que incluyó al marcador dTG63 permitió confirmar, en la mayoría de poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas, la existencia de un sitio de corte para *Hinf*I ubicado fuera de la región amplificada con los cebadores para el marcador CAPS dTG63 (resaltado en celeste, Anexo 3). Este sitio se encuentra mutado en la población de Morante y en *S. lycopersicum*, lo que explica los resultados de la Figura S.1 (Anexo 3).

No obstante, no haber podido validar el uso del marcador CAPS dTG63 para la detección del gen *Ph-2* en el genoma de las muestras analizadas, el ejercicio de alinear las secuencias de los productos de amplificación extensos obtenidos a partir de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas, conjuntamente con secuencias de *S. lycopersicum* pertenecientes a una variedad cultivable comercial susceptible a *P. infestans* (Río Grande), otra mejorada por introducción de los genes *Ph-2* y *Ph-3* (Iron Lady), y la secuencia incluida en el GeneBank, permitió observar que, con excepción de Morante, en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas la secuencia entre los nucleótidos 93 y 103,

así como los nucleótidos 215 y 216, han sido eliminados (resaltados en verde, Anexo 5). La ausencia de estos nucleótidos también se pudo observar en las secuencias reportadas para *S. pimpinellifolium* en Sol Genomics Network, pero no en las secuencias de *S. lycopersicum* del NCBI o en las obtenidas para las especies cultivables en este estudio. También se observaron diferencias de nucleótidos en las posiciones 209, 220 y 221: la primera sigue el mismo patrón de distribución entre las secuencias que las eliminaciones ya descritas, mientras que la segunda y tercera parecieran ser mutaciones puntuales, una solo presente en la población de Morante y la otra en la variedad cultivable de *S. lycopersicum* Iron Lady.

La imposibilidad de validar el uso del marcador CAPS dTG63 para la detección del gen *Ph-2* luego del análisis riguroso realizado combinando la obtención de secuencias de las distintas muestras y el análisis bioinformático a partir de las fuentes disponibles de secuencias de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*, pone en cuestión la validez universal de dicho marcador y plantea la necesidad de generar nuevos marcadores que permitan la detección inequívoca de este gen y contribuyan a su pronta identificación en el genoma.

Como se ha reportado previamente (Robertson & Labate, 2007; Foolad, 2007; ,Foolad & Panthee, 2012), las especies silvestres de tomate poseen genes de resistencia que son utilizados para la mejora continua del tomate cultivable, por lo general mediante cruzas directas. En particular, *S. pimpinellifolium* ha sido la primera fuente de los genes de resistencia, entre ellos los genes *Ph*, y en la actualidad se vienen descubriendo nuevos genes pertenecientes a las familias de proteínas como las WRKY (Li *et al*., 2015), así como

genes provenientes de otras especies silvestres como *S. pennellii* (Foolad *et al.*, 2006; Youssef & Mohamed, 2010; Li, 2010).

Se ha afirmado que la presencia simultánea de los genes *Ph-2* y *Ph-3* en el tomate provee una resistencia elevada a una amplia gama de aislamientos de *P. infestans* (Foolad & Panthee, 2012). Si bien en esta investigación no se ha podido determinar la presencia de *Ph-2* en las poblaciones estudiadas, sí se ha podido confirmar la presencia del gen *Ph-3* en todas ellas, la que ha sido asociada en estudios previos con una resistencia más potente y amplia que la generada por *Ph-1* y *Ph-2* respecto de un grupo de aislamientos de *P. infestans* de la zona del sudeste asiático (Chunwongse *et al*., 2002). A pesar de ello, los resultados de los ensayos de tipo "Detached-Leaf" realizados con todas las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas indican, tal como se mencionó párrafos arriba, niveles significativos de susceptibilidad a los dos aislamientos locales de patógeno utilizados. Esto demuestra que al menos los aislamientos locales de *P. infestans* puestos a prueba han superado las barreras defensivas impuestas por la proteína codificada por *Ph-3*, de acuerdo al modelo co-evolutivo mostrado en la Imagen 18. A pesar de las diferencias en agresividad ya referidas entre los aislamientos POX100 y CIP638, los niveles elevados de severidad y esporulación, sin diferencias significativas entre las poblaciones de *S. pimpinellifolium*, sugieren que en la actualidad los mecanismos de infección desarrollados por algunos aislamientos locales de *P. infestans* superan las defensas presentadas por poblaciones locales de *S. pimpinellifolium* de distinto origen geográfico. Este hallazgo resalta la agresividad adquirida por las versiones locales de *P. infestans* y plantea la

necesidad de emprender en el Perú la búsqueda de nuevos genes de resistencia a *P. infestans* en más poblaciones de *S. pimpinellifolium* u otras especies silvestres de tomate como *S. pennelli* y *S. habrochaites* (Li, 2010). En el Perú existen inclusive otras especies silvestres, como *S. peruvianum*, que se sabe contribuyen de forma significativa a la variabilidad genética del tomate en esta región (Miller & Tanksley, 1990). En cuanto a las aproximaciones que podrían utilizarse para estas búsquedas, destaca la reportada por Chen *et al.*, (2014) para la identificación en *S. pimpinellifolium* de un nuevo QTL (*qPh2.1*), que actuaría en conjunto con *Ph-3* para la neutralización de un aislamiento específico del patógeno. Esta técnica denominada RAD-seq (secuenciamiento de sitios de restricción asociados a ADN), que facilita la identificación de polimorfismos en un solo nucleótido (SNP) asociados a genes de resistencia en especies/variedades de las que se dispone de poca o nula información sobre sus secuencias. La técnica es entonces conveniente para el estudio de otras especies silvestres de tomate que existen en el Perú y que han sido poco atendidas.

En la última parte del trabajo se aprovechó la ventaja de contar con acceso virtual al genoma del tomate (Sol Genomics Network). El acceso permite llevar a cabo análisis bioinformáticos rápidos sobre la base de secuencias en evaluaciones iniciales que justifican la realización de análisis experimentales más complejos en etapas posteriores. Esto ha demostrado ser cierto en el caso de especies de importancia comercial, pero en el caso de genomas de especies silvestres como *S. pimpinellifolium* la calidad y cobertura de las secuencias liberadas es menor (Zhang *et al.*, 2014). Aun así, ha sido posible aprovechar

estas secuencias para diseñar cebadores y realizar análisis bioinformáticos de tipo exploratorio, si bien del presente estudio se desprende que es necesario generar nuevas secuencias en algunas regiones del genoma en las que los datos experimentales no corresponden a los disponibles en línea.

Los genes que codifican proteínas de resistencia (*R*) parecen estar dispersos en todo el genoma de tomate (Tanksley *et al.*, 1996; Sim *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; *Chen et al.*, 2014), aunque se ha demostrado la presencia de conglomerados de genes en el cromosoma 10 que están relacionados a la resistencia a *P. infestans* (López-Kleine *et al.*, 2013). La rápida evolución que están experimentando las razas de *P. infestans* a nivel mundial, en particular desde la aparición del tipo A2 en diversos países (Goodwin & Drenth, 1997), hace que la búsqueda de genes *R* se intensifique y en la actualidad se hagan barridos generales del genoma para identificar aquellos involucrados en la respuesta contra razas específicas del patógeno. De la misma manera, haciendo uso de evaluaciones bioinformáticas se logran identificar genes que pueden estar a su vez involucrados en la regulación de genes importantes para la resistencia a *P. infestans*. Este es el caso del gen ortólogo de Arabidopsis *DND1* presente en papa y tomate, cuyo silenciamiento aumenta la resistencia a aislamientos de *P. infestans* (Pic99177, USA618 y EC-1) (Sun *et al.*, 2015).

Siguiendo esta línea, en el presente estudio se realizaron análisis bioinformáticos para investigar la presencia de genes *R* potenciales en la cercanía de las regiones en las que anclan los cebadores de los marcadores CAPS dTG63 (*Ph-2*) y TG328 (*Ph-3*). Para ello se

usó el genoma liberado de *S. pimpinellifolium* (disponible en Sol Genomics Network) y se analizó la composición de dominios de las proteínas codificadas por los marcos abiertos de lectura (ORF) identificados en las regiones de 200 Kb exploradas. Este ejercicio tuvo como propósito inicial identificar los genes *Ph-2* y *Ph-3*, pero también otros genes *R* en caso se hallaran en estas regiones un conglomerado o una agrupación de genes de este tipo. Mientras el estudio se realizaba, el gen *Ph-3* fue identificado por mapeo genético (Zhang *et al.*, 2014), pero se continuó con la búsqueda de otros genes *R* potenciales en la región de 200 Kb definida. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, la calidad de las secuencias depositadas en las bases de datos de Sol Genomics Network es todavía limitada, puesto que los posibles genes encontrados en las regiones exploradas están en su mayoría incompletos (Imágenes 10-17). Incluso el gen *Ph-3*, ya descrito y secuenciado, está incompleto en su secuencia en la región que se ordenó (TG328-O, imagen 14). En cuanto a la región dTG63-O asociada al marcador no validado de *Ph-2*, no se encontraron genes que pudieran ser asociados por su estructura a resistencia a patógenos dentro de las 200 kb de secuencias analizadas.

Este estudio permitió realizar una primera exploración de la respuesta de poblaciones de *S. pimpinellifolium* de distintas áreas geográficas del Perú a aislamientos locales de *P. infestans*. Sin embargo, deben mencionarse algunas dificultades técnicas que han limitado la capacidad para obtener resultados más robustos. En primer lugar, el ensayo de tipo "Detached-leaf" no permite tener una visión completa de la respuesta de la planta al patógeno. Si bien es cierto es un ensayo práctico para aproximarse a la realidad de campo,

se le ha cuestionado por ser sensible a cambios menores en parámetros ambientales. Otra limitación fue que, al no poder determinar la presencia del gen *Ph-2*, no se pudo establecer si su presencia o ausencia tenía una influencia en la respuesta de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* a los aislamientos de *P. infestans* utilizados. Por último, la limitada calidad en la secuencia liberada del genoma de *S. pimpinellifolium* impidió llevar a cabo análisis más exhaustivos de la presencia de genes *R* relacionados a *P. infestans*. Ello dificulta también el desarrollo de nuevos marcadores moleculares que superen la pobre calidad de algunos marcadores propuestos, como ha quedado demostrado en el caso de dTG63 para la detección de *Ph-2*.

7. Conclusiones

- Las poblaciones de *S. pimpinellfiolium* de las regiones Piura y Lima no difieren estadísticamente en su respuesta a los aislamientos locales de *P. infestans* POX100 y CIP638 en los ensayos de tipo "Detached Leaf".
- El aislamiento de *P. infestans* POX100 es más virulento que el CIP638 en relación a las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas.
- La presencia del gen de resistencia *Ph-3* en *S. pimpinellifolium* no provee resistencia contra los aislamientos locales de *P. infestans* POX100 y CIP638.
- La región del genoma de tomate en la que se ha descrito el marcador CAPS dTG63 no está presente en las secuencias de tomates cultivables y silvestres disponibles en línea, ni en las secuencias de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* examinadas

como parte de este trabajo. Por lo tanto, este marcador no puede ser utilizado para determinar la presencia del gen *Ph-2* en estas poblaciones.

8. Recomendaciones

- Para evaluar con mayor rigor los niveles de resistencia/susceptibilidad a *P. infestans* en plantas de *S. pimpinellifolium*, es necesario trabajar un ensayo de campo con un mayor número de plantas y realizar un análisis de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC).
- Se debe realizar un estudio para contar con una caracterización actualizada de las diferentes razas de *P. infestans* que existen en el Perú, y determinar si el tipo A2 está presente.
- Se deben generar nuevos marcadores moleculares para ampliar el grupo disponible y poder determinar la presencia de genes de resistencia en tomates silvestres utilizando nuevas aproximaciones técnicas.
- Se deben revisar las secuencias liberadas como parte del genoma de *S. pimpinellifolium* para asegurar la calidad de las mismas y garantizar su utilidad para la realización de análisis bioinformáticos.

9. Referencias Bibliográficas

Abad, G. 1983. "*Phytophthora Infestans* En La Zona Central Del Peru: Rango de Hospedantes, Variabilidad Y Resistencia Varietal." Universidad Nacional Agraria La Molina.

Abreu, F. B., D. J. H. Silva, C. D. Cruz, y E. S. G. Mizubuti. 2008. "Inheritance of Resistance to Phytophthora Infestans (Peronosporales, Pythiaceae) in a New Source of Resistance in Tomato (Solanum Sp. (formerly Lycopersicon Sp.), Solanales, Solanaceae)." *Genet Mol Biol* 31 (2): 493–97.

Andolfo, G., W. Sanseverino, S. Rombauts, Y. Van de Peer, J. M. Bradeen, D. Carputo, L. Frusciante, y M. R. Ercolano. 2013. "Overview of Tomato (Solanum Lycopersicum) Candidate Pathogen Recognition Genes Reveals Important Solanum R Locus Dynamics." *The New Phytologist* 197 (1): 223–37.

Andolfo, G., F. Jupe, K. Witek, G. J. Etherington, M. R. Ercolano, y J. D. G. Jones. 2014. "Defining the Full Tomato NB-LRR Resistance Gene Repertoire Using Genomic and cDNA RenSeq." *BMC Plant Biology* 14 (1): 120.

Black, L. L., T. C. Wang, P. Hanson, y J. T. Chen. 1996. "Late Blight Resistance in Four Wild Tomato Accessions: Effectiveness in Diverse Locations and Inheritance of Resistance." *Phytopathology* 86:S24.

Brouwer, D. J., y D. a. St. Clair. 2004. "Fine Mapping of Three Quantitative Trait Loci for Late Blight Resistance in Tomato Using near Isogenic Lines (NILs) and Sub-NILs." *Theoretical and Applied Genetics* 108 (4): 628–38.

Brouwer, D. J., E. S. Jones, y D. a. St Clair. 2004. "QTL Analysis of Quantitative Resistance to *Phytophthora Infestans* (late Blight) in Tomato and Comparisons with Potato." *Genome* 47 (3): 475–92.

Brusca, J. P. 2003. "Inheritance of Tomato Late Blight Resistance from 'Richter's Wild Tomato' and Evaluation of a Late Blight Resistance Gene Combinations in Adapted Fresh Market Tomato Backgrounds." North Carolina State University.

Caicedo, A. L. 2008. "Geographic Diversity Cline of R Gene Homologs in Wild Populations of Solanum Pimpinellifolium (Solanaceae)." *American Journal of Botany* 95 (3): 393–98.

Chen, A., C. Liu, C. Chen, J. Wang, Y. Liao, C. Chang, M. Tsai, K. Hwu, y K. Chen. 2014. "Reassessment of QTLs for Late Blight Resistance in the Tomato Accession L3708 Using a Restriction Site Associated DNA (RAD) Linkage Map and Highly Aggressive Isolates of Phytophthora Infestans." *PLoS ONE* 9 (5): e96417.

Chunwongse, C., L. Black, y P. Hanson. 2002. "Molecular Mapping of the Ph -3 Gene for Late Blight Resistance in Tomato." *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 3: 281–86.

Cocaliadis, M. F. 2013. "Desarrollo Y Utilización de Marcadores Moleculares Para El Genotipado de La Colección de Líneas de Introgresión de Solanum Lycopersicoides En El Fondo Genético Del Tomate Cultivado." Universidad Politécnica Valencia.

Dahan, J., y H. Mireau. 2013. “The Rf and Rf-like PPR in Higher Plants, a Fast-Evolving Subclass of PPR Genes.” *RNA Biology* 10 (9): 1469–76.

Dale, F. 2006. *Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Volume II: Tomato*. *Experimental Agriculture*. Vol. 42. Science Publishers.

DeYoung, B. J., D. Qi, S. Kim, T. P. Burke, y R. W. Innes. 2012. “Activation of a Plant Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat Disease Resistance Protein by a Modified Self Protein.” *Cellular Microbiology* 14 (7): 1071–84.

Foolad, M. R., H. Ashrafi, H. L. Merk, y M. P. Kinkade. 2006. “Identification of New Sources of Late Blight Resistance in Tomato and Mapping of a New Resistance Gene.” In *22nd Annual Tomato Disease Workshop*.

Foolad, M. R. 2007. “Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato.” *International Journal of Plant Genomics* 2007: 1–52.

Foolad, M. R., H. L. Merk, y H. Ashrafi. 2008. “Genetics, Genomics and Breeding of Late Blight and Early Blight Resistance in Tomato.” *Critical Reviews in Plant Sciences* 27 (2): 75–107.

Foolad, M. R., y D. R. Panthee. 2012. “Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding.” *Critical Reviews in Plant Sciences* 31 (2): 93–123.

Forbes, G., W. Perez, y J. A. Piedra. 2014. *Evaluacion de La Resistencia En Genotipos de Papa a Phytophthora Infestans Bajo Condiciones de Campo: Guia Para Colaboradores Internacionales.*

Fraser, D. E., P. B. Shoemaker, y J. B. Ristaino. 1999. “Characterization of Isolates of Phytophthora Infestans from Tomato and Potato in North Carolina from 1993 to 1995.” *Plant Disease* 83 (7): 633–38.

Fry, W. E., M.T. McGrath, a. Seaman, T. a. Zitter, a. McLeod, G. Danies, I. M. Small, et al. 2013. “The 2009 Late Blight Pandemic in Eastern USA – Causes and Results.” *Plant Disease* 97 (3): 296–306.

Fry, W. 2008. “Phytophthora Infestans: The Plant (and R Gene) Destroyer.” *Molecular Plant Pathology* 9 (3): 385–402.

Gale, M. D., y K. M. Devos. 1998. “Plant Comparative Genetics after 10 Years.” *Science* 282 (5389): 656–59.

Garry, G., A. Salas, G. a. Forbes, W. Perez, M. Santa Cruz, y R. J. Nelson. 2005. “Host Specialization Not Detected Among Isolates of the EC-1 Lineage of Phytophthora Infestans Attacking Wild and Cultivated Potatoes in Peru.” *European Journal of Plant Pathology* 113 (1): 71–81.

Geddy, R., y G. G. Brown. 2007. “Genes Encoding Pentatricopeptide Repeat (PPR) Proteins Are Not Conserved in Location in Plant Genomes and May Be Subject to Diversifying Selection.” *BMC Genomics* 8 (1): 130.

Goodwin, S. B., y a. Drenth. 1997. “Origin of the A2 Mating Type of Phytophthora Infestans Outside Mexico.” *Phytopathology* 87 (10): 992–99.

Goodwin, S. B., R. E. Schneider, y W. E. Fry. 1995. "Use of Cellulose-Acetate Electrophoresis for Rapid Identification of Allozyme Genotypes of Phytophthora Infestans." *Plant Disease* 79 (11): 1181–85.

Goss, E. M., J. F. Tabima, D. E. L. Cooke, S. Restrepo, W. E. Fry, G. a. Forbes, V. J. Fieland, M. Cardenas, y N. J. Grunwald. 2014. "The Irish Potato Famine Pathogen Phytophthora Infestans Originated in Central Mexico rather than the Andes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (24): 8791–96.

Grünwald, N. J., W. G. Flier, A. K. Sturbaum, E. Garay-Serrano, T. B. M. van Den Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, L. J. Turkensteen, y W. E. Fry. 2001. "Population Structure of Phytophthora Infestans in the Toluca Valley Region of Central Mexico" *Phytopahtology* 9 (91): 882-890.

Hardham, A. R., y L. M. Blackman. 2010. "Molecular Cytology of Phytophthora–plant Interactions." *Australasian Plant Pathology* 39 (1): 29.

Hein, I., E. M. Gilroy, M. R. Armstrong, y P. R. J. Birch. 2009. "The Zig-Zag-Zig in Oomycete-Plant Interactions." *Molecular Plant Pathology* 10 (4): 547–62.

INEI. 2014. "Compendio Estadístico Perú 2014. Capítulo 12 - Agrario."

Irzhansky, I., y Y. Cohen. 2006. "Inheritance of Resistance against Phytophthora Infestans in Lycopersicon Pimpenellifolium L3707." *Euphytica* 149 (3): 309–16.

Jones, J. D. G., y J. L. Dangl. 2006. "The Plant Immune System." *Nature* 444

Kim, M., y M. A. Mutschler. 2005. "Transfer to Processing Tomato and Characterization of Late Blight Resistance Derived from Solanum Pimpinellifolium L. L3708." *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 130 (6): 877–84.

Labate, J. A., S. Grandillo, T. Fulton, S. Muños, A. L. Caicedo, I. Peralta, Y. Ji, et al. 2007. "Tomato." In *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, 5 Vegetabl:1–125.

Labate, J. A., y A. M. Baldo. 2005. "Tomato SNP Discovery by EST Mining and Resequencing." *Molecular Breeding* 16 (4): 343–49.

Li, J., Y. Luan, y Z. Liu. 2015. "SpWRKY1 Mediates Resistance to Phytophthora Infestans and Tolerance to Salt and Drought Stress by Modulating Reactive Oxygen Species Homeostasis and Expression of Defense-Related Genes in Tomato." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 123 (1). Springer Netherlands: 67–81.

Li, J. 2010. "Exploration of Wild Relatives of Tomato for Enhanced Stress Tolerance." Wageningen University.

Li, J., L. Liu, Y. Bai, R. Finkers, F. Wang, Y. Du, Y. Yang, B. Xie, R. G. F. Visser, y A. W. van Heusden. 2011. "Identification and Mapping of Quantitative Resistance to Late Blight (Phytophthora Infestans) in Solanum Habrochaites LA1777." *Euphytica* 179 (3): 427–38.

Li, J., Q. Sun, N. Yu, J. Zhu, X. Zou, Z. Qi, M. A. Ghani, y L. Chen. 2014. "The Role of Small RNAs on Phenotypes in Reciprocal Hybrids between Solanum Lycopersicum and S. Pimpinellifolium." *BMC Plant Biology* 14 (1): 296.

López-Kleine, L., A. Pinzón, D. Chaves, S. R., y D. M. Riaño-Pachón. 2013. “Chromosome 10 in the Tomato Plant Carries Clusters of Genes Responsible for Field Resistance/defence to Phytophthora Infestans.” *Genomics* 101 (4): 249–55.

Lozano, R., O. Ponce, M. Ramirez, N. Mostajo, y G. Orjeda. 2012. “Genome-Wide Identification and Mapping of NBS-Encoding Resistance Genes in Solanum Tuberosum Group Phureja.” *PLoS ONE* 7 (4): e34775.

Madden, L.V., y M. Wheelis. 2003. “The Threat of Plant Pathogens as Weapons Against U.S. Crops.” *Annual Review of Phytopathology* 41 (1): 155–76.

Marone, D., M. Russo, G. Laidò, A. De Leonardis, y A. Mastrangelo. 2013. “Plant Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses.” *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4): 7302–26.

Mayton, H., C. D. Smart, B. C. Moravec, E. S. G. Mizubuti, a. E. Muldoon, y W. E. Fry. 2000. “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 (11): 1190–96.

Mazzucotelli, E., S. Belloni, D. Marone, A. De Leonardis, D. Guerra, N. Di Fonzo, L. Cattivelli, y A. Mastrangelo. 2006. “The e3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation.” *Current Genomics* 7 (8): 509–22.

McHale, L., X. Tan, P. Koehl, y R. W. Michelmore. 2006. “Plant NBS-LRR Proteins: Adaptable Guards.” *Genome Biology* 7: 212.

Miller, J. C., y S. D. Tanksley. 1990. “RFLP Analysis of Phylogenetic Relationships and Genetic Variation in the Genus Lycopersicon.” *Theoretical and Applied Genetics* 80 (4): 437–48.

Mitsuda, N., y M. Ohme-Takagi. 2008. “NAC Transcription Factors NST1 and NST3 Regulate Pod Shattering in a Partially Redundant Manner by Promoting Secondary Wall Formation after the Establishment of Tissue Identity.” *The Plant Journal* 56 (5): 768–78.

Mitsuda, N., M. Seki, K. Shinozaki, y M. Ohme-Takagi. 2005. “The NAC Transcription Factors NST1 and NST2 of Arabidopsis Regulate Secondary Wall Thickenings and Are Required for Anther Dehiscence.” *The Plant Cell* 17 (11): 2993–3006.

Moreau, P., P. Thoquet, J. Olivier, H. Laterrot, N. Grimsley, y L. De Biologie. 1998. “Genetic Mapping of Ph-2 , a Single Locus Controlling Partial Resistance to Phytophthora Infestans in Tomato.” *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 11 (4): 259–69.

Moyle, L. C. 2008. “Ecological and Evolutionary Genomics in the Wild Tomatoes (Solanum Sect. Lycopersicon).” *Evolution* 62 (12): 2995–3013.

Nowakowska, M., M. Nowicki, U. Kłosińska, R. Maciorowski, y E. U. Kozik. 2014. “Appraisal of Artificial Screening Techniques of Tomato to Accurately Reflect Field Performance of the Late Blight Resistance.” *PLoS ONE* 9 (10): e109328.

Nowicki, M., M. R. Foolad, M. Nowakowska, y E. U. Kozik. 2012. “Potato and Tomato Late Blight Caused by Phytophthora Infestans : An Overview of Pathology and Resistance Breeding.” *Plant Disease* 96 (1): 4–17.

Nowicki, M., U. Kozik, y M. R. Foolad. 2013. “Late Blight of Tomato.” In *Translational Genomics for Crop Breeding, Volume I: Biotic Stress*, I:241–65.

O’Toole, N., M. Hattori, C. Andres, K. Iida, C. Lurin, C. Schmitz-Linneweber, M. Sugita, y I. Small. 2008. “On the Expansion of the Pentatricopeptide Repeat Gene Family in Plants.” *Molecular Biology and Evolution* 25 (6): 1120–28.

Ortiz, O., P. Winters, y H. Fano. 1999. “La Percepción de Los Agricultores Sobre El Problema Del Tizón Tardío O Rancha Y Su Manejo: Estudios de Casos En Cajamarca, Perú.” *Revista Latinoamericana de La Papa*, 97–120.

Pan, Q., Y. S. Liu, O. Budai-Hadrian, M. Sela, L. Carmel-Goren, D. Zamir, y R. Fluhr. 2000. “Comparative Genetics of Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat Resistance Gene Homologues in the Genomes of Two Dicotyledons: Tomato and Arabidopsis.” *Genetics* 155: 309–22.

Panthee, D. R., R. G. Gardner, R. Ibrahem, y C. Anderson. 2015. “Molecular Markers Associated with Ph- 3 Gene Conferring Late Blight Resistance in Tomato.” *American Journal of Plant Sciences* 6: 2144–50.

Park, P. H., Y. Chae, H. Kim, K. Chung, D. Oh, y K. Kim. 2010. “Development of a SCAR Marker Linked to Ph-3 in Solanum Ssp.” *Korean Journal of Breeding Science* 42 (2): 139–43.

Peirce, L. C. 1971. “Linkage Tests with Ph Conditioning Resistance to Race 0, Phytophthora Infestans.” *Report of the Tomato Genomics Cooperative* 21: 30.

Peralta, I., S. Knapp y D. Spooner. 2008. "Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*)". *American Society of Plant Taxonomists.*

Pérez, W., y G. Forbes. 2008. "*El Tizón Tardío de La Papa*".

Pérez, W. G., J. S. Gamboa, Y. V. Falcon, M. Coca, R. M. Raymundo, y R. J. Nelson. 2001. “Genetic Structure of Peruvian Populations of Phytophthora Infestans.” *Phytopathology* 91 (10): 956–65.

Petchaboon, K., N. Srisawad, P. Pongam, C. Chunwongse, y J. Chunwongse. 2014. “Phenotypic and Genotypic Structure of Phytophthora Infestans Populations on Tomato and Potato in the North of Thailand in 2000–2002.” *European Journal of Plant Pathology* 140 (3): 441–54.

Rattan, R. S., y S. S. Saini. 1979. “Inheritance of Resistance to Fruit Rot (Phytophthora Parasitica Dast.) in Tomato (Lycopersicon Esculentum Mill.).” *Euphytica* 28: 315–17.

Rick, C. M., y R. T. Chetelat. 1995. “Utilization of Related Wild Species for Tomato Improvement.” *Acta Horticulturae* 412: 21–38.

Rick, C. M, y J. F. Fobes. 1975. “Allozyme Variation in the Cultivated Tomato and Closely Related Species Tomato Variation in the Cultivated X . Allozyme and Closely Related

Species.” *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102 (6): 376–84.

Robbins, M. D., M. A. T. Masud, R. G. Gardner, M. River, y D. M. Francis. 2010. “Marker-Assisted Selection for Coupling Wilt Virus and Phytophthora Infestans (Late Blight) in Tomato.” *Horticultural Science* 45 (10): 1424–28.

Robertson, L. D., y J. A. Labate. 2007. *Genetic Resources of Tomato (Lycopersicon Esculentum Mill.) and Wild Relatives*. Edited by Maharaj K. Razdan and Autar K. Matoo. *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*. Vol. 2.

Rose, a., I. Meier, y U. Wienand. 1999. “The Tomato I-Box Binding Factor LeMYBI Is a Member of a Novel Class of Myb-like Proteins.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 20 (6): 641–52.

Rubio, V., F. Linhares, R. Solano, A. C. Martín, Joaquín Iglesias, Antonio Leyva, y Javier Paz-Ares. 2001. “A Conserved MYB Transcription Factor Involved in Phosphate Starvation Signaling Both in Vascular Plants and in Unicellular Algae.” *Genes & Development* 15 (16): 2122–33.

Sanseverino, W., G. Roma, M. De Simone, L. Faino, S. Melito, E. Stupka, L. Frusciante, y M. R. Ercolano. 2010. “PRGdb: A Bioinformatics Platform for Plant Resistance Gene Analysis.” *Nucleic Acids Research* 38 (Database): D814–21.

Sharma, A., L. Zhang, D. Niño-Liu, H. Ashrafi, y M. R. Foolad. 2008. “A *Solanum Lycopersicum* × *Solanum Pimpinellifolium* Linkage Map of Tomato Displaying Genomic Locations of R-Genes, RGAs, and Candidate Resistance/Defense-Response ESTs.” *International Journal of Plant Genomics* 2008: 1–18.

Sim, S., M. D. Robbins, C. Chilcott, T. Zhu, y D. M. Francis. 2009. “Oligonucleotide Array Discovery of Polymorphisms in Cultivated Tomato (Solanum Lycopersicum L.) Reveals Patterns of SNP Variation Associated with Breeding.” *BMC Genomics* 10.

Small, I. D., y N. Peeters. 2000. “The PPR Motif - a TPR-Related Motif Prevalent in Plant Organellar Proteins.” *Trends in Biochemical Sciences* 25 (2): 46–47.

Sun, K., A. A. Wolters, A. E. H. M. Loonen, R. P. Huibers, R. van der Vlugt, A. Goverse, E. Jacobsen, R. G. F. Visser, y Y. Bai. 2015. “Down-Regulation of Arabidopsis DND1 Orthologs in Potato and Tomato Leads to Broad-Spectrum Resistance to Late Blight and Powdery Mildew.” *Transgenic Research*.

Swiderski, M. R., y R. W. Innes. 2001. “The Arabidopsis PBS1 Resistance Gene Encodes a Member\nof a Novel Protein Kinase Subfamily.” *Plant J.* 26: 101–12.

Tameling, W. I. L., S. D. J. Elzinga, P. S. Darmin, J. H. Vossen, F. L. W. Takken, M. a. Haring, y B. J. C. Cornelissen. 2002. “The Tomato R Gene Products I-2 and MI-1 Are Functional ATP Binding Proteins with ATPase Activity.” *The Plant Cell* 14 (11): 2929–39.

Tanksley, S. D., S. Grandillo, T. M. Fulton, D. Zamir, Y. Eshed, V. Petiard, J. Lopez, y T. Beck-Bunn. 1996. “Advanced Backcross QTL Analysis in a Cross between an Elite Processing Line of Tomato and Its Wild Relative L. Pimpinellifolium.” *Theoretical and Applied Genetics* 92: 213–24.

Tooley, P. W., C. D. Therrien, y D. L. Ritch. 1989. “Mating Type , Race Composition , Nuclear DNA Content , and Isozyme Analysis of Peruvian Isolates of Phytophthora Infestans.” *Phytopathology* 79: 478–81.

Vleeshouwers, V. G. A. A., W. Van Dooijeweert, L. C. P. Keizer, L. Sijpkes, F. Govers, y L. T. Colon. 1999. “A Laboratory Assay for Phytophthora Infestans Resistance in Various Solanum Species Reflects the Field Situation.”

Warren, R. F., a. Henk, P. Mowery, E. Holub, y R. W. Innes. 1998. “A Mutation within the Leucine-Rich Repeat Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Gene RPS5 Partially Suppresses Multiple Bacterial and Downy Mildew Resistance Genes.” *The Plant Cell* 10 (September): 1439–52.

Yasumura, Y., E. C. Moylan, y J. a. Langdale. 2005. “A Conserved Transcription Factor Mediates Nuclear Control of Organelle Biogenesis in Anciently Diverged Land Plants.” *The Plant Cell* 17 (7): 1894–1907.

Youssef, A., y A. Mohamed. 2010. “Inheritance of Resistance to Tomato Late Blight in a Population of Solanum Lycopersicum X Solanum Habrochaites.”

Zhang, C., L. Liu, X. Wang, J. Vossen, G. Li, T. Li, Z. Zheng, et al. 2014. “The Ph-3 Gene from Solanum Pimpinellifolium Encodes CC-NBS-LRR Protein Conferring Resistance to Phytophthora Infestans.” *Theoretical and Applied Genetics* 127 (6): 1353–64.

Zhang, C., L. Liu, Z. Zheng, Y. Sun, L. Zhou, Y. Yang, F. Cheng, et al. 2013. “Fine Mapping of the Ph-3 Gene Conferring Resistance to Late Blight (Phytophthora Infestans) in Tomato.” *Theoretical and Applied Genetics* 126 (10): 2643–53.

Zhang, J., W. Li, T. Xiang, Z. Liu, K. Laluk, X. Ding, Y. Zou, et al. 2010. “Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a Pseudomonas Syringae Effector.” *Cell Host & Microbe* 7 (4). Elsevier Inc.: 290–301.

Zhang, Z., J. Zhu, B. Song, Y. Li, S. Tian, y H. Jiang. 2001. “Further Investigation on A2 Mating Type of Phytophthora Infestans in China.”

Zuriaga, E., J. M. Blanca, L. Cordero, A. Sifres, W. G. Blas-Cerdán, R. Morales, y F. Nuez. 2009. “Genetic and Bioclimatic Variation in Solanum Pimpinellifolium.” *Genetic Resources and Crop Evolution* 56 (1): 39–51.

10. Anexos

Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN de hojas

a) Preparación de soluciones para la extracción de ADN a partir de hojas

1. Buffer de extracción CTAB 2%

Solución	Volumen final 5 mL (hasta 7 muestras)	Volumen final 12 mL (hasta 16 muestras)
Tris.HCl 1M pH 8.0	0.5 mL	1.2 mL
NaCl 5M	1.4 mL	3.36 mL
EDTA 0.5M	0.25 mL	0.6 mL
CTAB	0.1 g	0.24 g
H_2O	Completar 5 mL	Completar 12 mL

Colocar primero las soluciones en la mitad del volumen de agua, calentar a 65ºC y finalmente agregar el CTAB.

La solución siempre se debe de usar fresca.

2. Buffer de extracción CTAB10%

Solución	Volumen final 1 mL (hasta 7 muestras)
Tris.HCl 1M pH 8.0	100 µL
NaCl 5M	140 µL
EDTA 0.5M	40 µL
CTAB	0.1 g
H_2O	Completar 1 mL

b) Extracción del ADN

1. Pesar aproximadamente 100 mg de tejido de hoja, que se vean en buen estado, sobre papel aluminio.
2. Colocar los 100 mg de tejido en el interior del tubo de 2.0 mL y enfriar en una congeladora por aproximadamente 10 min. A la par, preparar el buffer de extracción CTAB 2%.
3. Sacar el microtubo frío y sumergirlo en nitrógeno líquido hasta cubrir la mitad del tubo.
4. Inmediatamente después, introducir un embolo para pulverizar la hoja. Deberá obtenerse un polvo muy fino.
5. Añadir 700 µL de buffer de extracción CTAB 2%. Agregar luego 2 µL de 2-mercaptoetanol.
6. Incubar a 65ºC por 50 min con inversiones del microtubo cada 15 min. Dejar enfriar aproximadamente 10 min.
7. Adicionar 700 µL cloroformo : alcohol isoamílico (24:1). Invertir suavemente varias veces.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 5 min.
9. Extraer la fase acuosa superior y transferirla a un nuevo tubo.
10. Añadir 50 µL de buffer de extracción CTAB 10% y mezclar suavemente.

11. Repetir los pasos del 8 al 11.
12. Añadir un volumen igual de isopropanol frío (400 – 500 µL) a cada microtubo. Mezclar suavemente por inversión.
13. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min. Retirar el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado.
14. Lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min. Retirar el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado.
15. Lavar el precipitado con 1 mL de etanol al absoluto. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min. Retirar el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado.
16. Invertir los tubos y dejar secar sobre papel toalla por 10 min.
17. Resuspender el ADN en 150 µL de agua libre de nucleótidos (NFW).

c) Cuantificación del ADN

La cuantificación de la cantidad de ADN se realiza utilizando el equipo Eppendorf BioPhotometer® D30. Este equipo es un espectrofotómetro optimizado para lecturas de ácidos nucleicos, y requiere 2 µL de material para determinar su concentración.

d) Electroforesis en gel de agarosa

1. Preparar un gel de agarosa al 0.8% en buffer de corrida (TAE).
2. Añadir GelRed 10000X a la solución de gel para teñirlo (basta con 1.5 µL por cada 30 mL de volumen)
3. Preparar el ADN a analizar mezclando 5 µL del ADN extraído más 1 µL de “loading buffer” 6x. Incluir 5 µL de marcador Lambda HindIII.
4. Cargar las muestras dentro de cada pozo del gel.
5. Conectar la cámara a la fuente de poder, fijar el voltaje en 80 V e iniciar la electroforesis por 45 minutos.
6. Observar en un analizador de imágenes. Verificar que el ADN aparezca como una banda discreta de alto peso molecular.

Anexo 2: Datos de experimentos de Detached-Leaf

Ensayo de Prueba:

	CIP638								POX100							
Población	**Severidad**				**Esporulación**				**Severidad**				**Esporulación**			
Azpitia	70	70	70	70	2	2	2	2	100	100	100	100	3	3	3	3
	70	70	60	50	2	2	1	1	100	100	90	90	3	3	3	3
	50	40	40	20	1	1	1	1	80	80	70	70	3	3	3	3
Colán	60	50	50	50	2	2	2	2	90	90	90	90	3	3	3	3
	40	40	40	40	2	2	2	2	90	80	80	80	3	3	3	3
	30	30	30	20	2	1	1	1	80	80	70	70	3	3	3	3
									70	70	70	70	3	3	3	3
Pantanos de Villa	70	70	50	40	1	1	1	1	90	80	70	70	3	3	3	3
	40	40	30	30	1	1	1	1	70	60	60		3	3	3	
	30	30	25	25	1	1	1	1								
Tambogrande	25	25	20	20	2	2	2	1	80	80	80	70	3	3	3	3
	20	20	15	15	1	1	1	1	70	70	70	70	3	3	3	3
	15	15	15	10	1	1	1	1	60	60	60	50	3	3	3	3
UNALM	50	45	45	45	2	2	2	2	90	80	70	70	3	3	3	3
	35	25	20	20	2	2	1	1	70	70	70	70	3	3	3	3
	20	15	15	15	1	1	1	1	70	60	60	60	3	3	3	3

No hubo población de Morante debido a que no se logró hacer crecer a tiempo.

La concentración de esporangios utilizada en el inóculo es de 3000 esporangios/mL.

Experimento 1:

Resultados para accesión CIP638

	750 esporangios/mL								1500 esporangios/mL								3000 esporangios/mL							
Población	**Severidad**				**Esporulación**				**Severidad**				**Esporulación**				**Severidad**				**Esporulación**			
Azpitia	90	80	70	70	3	3	3	3	100	100	100	100	3	3	3	3	100	100	100	90	3	3	3	3
	60	60	60	50	3	3	3	3	80	80	70	70	3	3	3	3	90	90	90	90	3	3	3	3
	50	50	50	50	3	3	3	3	60	60	60	60	3	3	3	3	80	70	70	60	3	3	3	3
	50	40	40	40	3	3	3	3	60	60	60	50	3	3	3	3	60	60	60	60	3	3	3	3
	40	40	40	30	3	2	2	2	50	50	40	40	3	3	3	3	60	50	50	50	3	3	3	3
Colán	90	80	60	60	3	3	3	3	100	100	90	80	3	3	3	3	100	100	100	80	3	3	3	3
	50	50	50	50	3	3	3	3	70	70	70	70	3	3	3	3	80	70	70	60	3	3	3	3
	40	40	40	40	3	3	3	3	70	70	70	70	3	3	3	3	60	60	60	60	3	3	3	3
	40	40	40		3	3	2		60	60	50	50	3	3	3	3	60	60	60	50	3	3	3	3
									50	50	40	30	3	3	3	2	50	50	50	40	3	3	3	3
Pantanos de Villa	50	40	40	40	3	3	3	3	50	40	40	30	3	3	3	3	60	50	50	50	3	3	3	3
	40	30	30	30	3	3	3	3	30	30	30	30	3	3	3	3	50	40	40	40	3	3	3	3
	30	30	30	30	3	2	2	2	30	30	30	30	3	3	3	2	40	30	30	30	3	3	3	3
	20	20	10		2	2	1		30	20	20		2	2	2		30	20	20		3	3	3	
Tambogrande	60	60	60	50	3	3	3	3	80	70	70	60	3	3	3	3	60	50	50	50	3	3	3	3
	50	50	50	50	3	3	3	3	60	50	40	40	3	3	3	3	50	50	40	40	3	3	3	3
	40	40	40	40	3	3	3	3	40	40	40	40	3	3	3	3	40	40	40	40	3	3	3	3
	40	30	30		3	3	2		40	40	30		3	3	3	3	40	30	30		3	3	3	3
UNALM	60	60	60	50	3	3	3	3	70	60	60	50	3	3	3	3	70	50	40	40	3	3	3	3
	50	40	40	40	3	3	3	3	50	50	50	50	3	3	3	3	40	40	40	40	3	3	3	3
	40	30	30	30	3	2	2	2	40	40	40	40	3	3	3	3	40	40	40	30	3	3	3	3
	30	30	20		2	2	1		40	30	30		3	2	2		30	30	30		3	3	3	

No hubo población de Morante debido a que no se logró hacer crecer a tiempo.

Resultados para accesión POX100

	750 esporangios/mL						1500 esporangios/mL						3000 esporangios/mL					
Población	**Severidad**			**Esporulación**			**Severidad**			**Esporulación**			**Severidad**			**Esporulación**		
Azpitia	40	40	20	1	1	1	40	20	20	1	1	1	40	30	30	2	1	1
	20	20	10	1	1	1	20	20	10	1	1	1	30	30	30	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	10	10	10	1	1	1	20	20	20	1	1	1
Colán	10	10	10	1	1	1	40	40	30	1	1	1	40	40	30	2	1	1
	0	0	0	0	0	0	30	30	30	1	1	1	30	30	30	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	30	20	20	1	1	1	30	30	30	1	1	1
							20	20	20	1	1	1	20	20	20	1	1	1
Pantanos de Villa	30	20	10	1	1	1	40	30	30	1	1	1	40	30	30	1	1	1
	10	10	0	1	1	0	30	20	20	1	1	1	30	30	30	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	20	10	10	1	1	1	30	30	20	1	1	1
Tambogrande	40	40	30	1	1	1	30	30	30	2	2	2	100	100	60	2	2	2
	30	20	10	1	1	1	30	20	20	1	1	1	40	40	30	2	1	1
	0	0	0	0	0	0	20	20	20	1	1	1	30	30	30	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	20	10	10	1	1	0	30	30	30	1	1	1
UNALM	30	20	10	2	1	1	30	30	30	1	1	1	40	40	40	2	1	1
	10	10	10	1	1	1	20	20	20	1	1	1	30	30	30	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	20	20	10	1	1	1	20	20	10	1	1	1

No hubo población de Morante debido a que no se logró hacer crecer a tiempo.

Experimento 2:

	CIP638								POX100							
Población	**Severidad**				**Esporulación**				**Severidad**				**Esporulación**			
	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80	70	70	2	1	1	1
Azpitia	0	0	0	0	0	0	0	0	60	60	60	40	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	3				1			
	20	20	20	15	1	1	1	1	80	80	70	70	2	2	2	1
Colán	10	10	10	10	1	1	1	1	70	60	60	60	1	1	1	1
	5				1				60				1			
Morante	10	5	10		1	1	1		-				-			
	10	10	10	10	1	1	1	1	90	90	80	80	1	1	1	1
Pantanos de Villa	10	5	5	5	1	1	1	1	80	80	70	70	1	1	1	1
	5	5	0	0	1	1	0	0	60	60	60	50	1	1	1	1
Tambogrande	30	20	20	5	2	1	1	1	-				-			
	5	5	5	0	1	1	1	0	80	80	80	70	2	1	1	1
UNALM	0	0	0	0	0	0	0	0	70	70	70	60	1	1	1	1
	0				0				60	40	40	20	1	1	1	1

En el caso de Morante y Tambogrande, se prefirió trabajar con la accesión CIP638 por ser la menos agresiva, lo que podría darnos resultados más fáciles de comparar entre poblaciones.

Experimento 3:

	CIP638						POX100					
Población	**Severidad**			**Esporulación**			**Severidad**			**Esporulación**		
Azpitia	80	70	60	1	1	1	100	100	100	3	2	2
	60	40	40	1	1	1	90	60	60	2	1	1
Colán	100	100	100	2	1	1	100	90	80	3	1	1
	80	70	70	1	1	1	70	60	60	1	1	1
	50	40	20	1	1	1	50	40	40	1	1	1
Morante	80	80	70	2	2	2	90	90	80	3	2	2
	70	60	60	2	1	1	70	70	60	2	2	1
	60	60	60	1	1	1	60	60	50	1	1	1
	50	40		1	1		30	0		1		
Pantanos de Villa	80	60	60	1	1	1	90	80	80	2	2	1
	40	40	04	1	1	1	80	70	60	1	1	1
	40	10	0	1	1		50	50	0	1	1	
UNALM	100	70	70	1	1	1	100	100	90	3	3	2
	60	60	50	1	1	1	90	90	90	2	2	2
	40	30	0	1	1		80	60	40	2	1	1

No hubo población de Tambogrande debido a que no se logró hacer crecer a tiempo.

Anexo 3: Generación de cebadores y amplificación del marcador dTG63

Dado que la secuencia completa del genoma de *S. lycopersicum* está disponible, se realizó un análisis bioinformático en la región del genoma en la que se ubica dTG63 para confirmar que los cebadores utilizados estuviesen bien diseñados y permitiesen amplificar *in silico* una secuencia del tamaño esperado. En el cromosoma 10, donde ha sido localizado dTG63, se encuentra la siguiente región:

CTTGCGGGAATTTAACTTGACAGTCCACCCGGTTGATGAAAATGACATGAGAAGGAAAAGACTTAAGAACTTC
ATCAAGTGTAAACTACTAAGCCTTTCTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAA
TGCCTGTTTACCTGAGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTCGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATTATCAAC
TTTGTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGACACTATTT
CCCTAATAGTATGTTCCAAAAAGAACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATTGACTTCTT

Las regiones resaltadas en amarillo muestran las secuencias que se alinean mejor con las secuencias de los cebadores utilizados, y en rojo la secuencia amplificada. En el caso del cebador reverse, se detectó una discordancia (resaltada en verde). Es preciso notar que dentro de la región de amplificación teórica no se encuentra el sitio de corte para *Hinf*I, esperado en este caso por tratarse de la secuencia de una planta susceptible como *S. lycopersicum* que no debería tener el gen *Ph-2*, asociado a la presencia de este sitio de corte. Este ejercicio se repitió con los archivos de la secuencia completa de *S. pimpinellifolium*, organizada en contigs en la página web de Sol Genomics Network. Mediante el uso de BLAST de la misma página, se identificó la región más parecida a la secuencia de *S. lycopersicum* referida en el contig "contig:unspecified:3806640:1:4507:1 contig 3806640":

CCTTGCGGGAATTTAACTTGACAGTCCACCCGGTTGATGAAAATGACATGAGAAGGAAAAGACTTAAGAACTC
CATCAAGTGTAAACTTCTAAGCTTTTCTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAA
ATGCCTGTTTACCTGAGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTCGCTTTTCCAGATTATCAACTTTGTTTT
TCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGACACTATTTCCCTAATA
GTATGTCCCAAAGAACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATTGACTCTT

Se notó la presencia de la misma discordancia en la región correspondiente a la unión del cebador reverse que en la secuencia de *S. lycopesicum* y por ello se decidió sintetizar un nuevo cebador reverse que incluyese la modificación necesaria para lograr una hibridación perfecta:

Tabla S.1 Marcadores CAPS y secuencais forward y reverse nuevo para dTG63

Marcadores CAPS	Secuencia 5'→3'
dTG63 Forward	CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTG
dTG63 Reverse modificado	AAAAATTTTCAACCATAGAATGATT

A pesar del cambio realizado, no se obtuvo ninguna amplificación. Se optó entonces por diseñar cebadores que permitiesen amplificar una región más extensa en el genoma de *S. pimpinellifolium* que contuviese el amplicón original y secuenciarla, utilizando el programa Primer3 (v2.3.6).

Tabla S.2 Secuencia de cebadores diseñados para amplificar región que contenga dTG63

Primers	Secuencia 5'→3'

dTG63-M-Forward	GGTTGATGAAAATGACATGAG
dTG63-M-Reverse	CATGTCCAGTTGAGGAGCGAG

Dentro de la secuencia del contig, se identifican los elementos descritos hasta el momento:

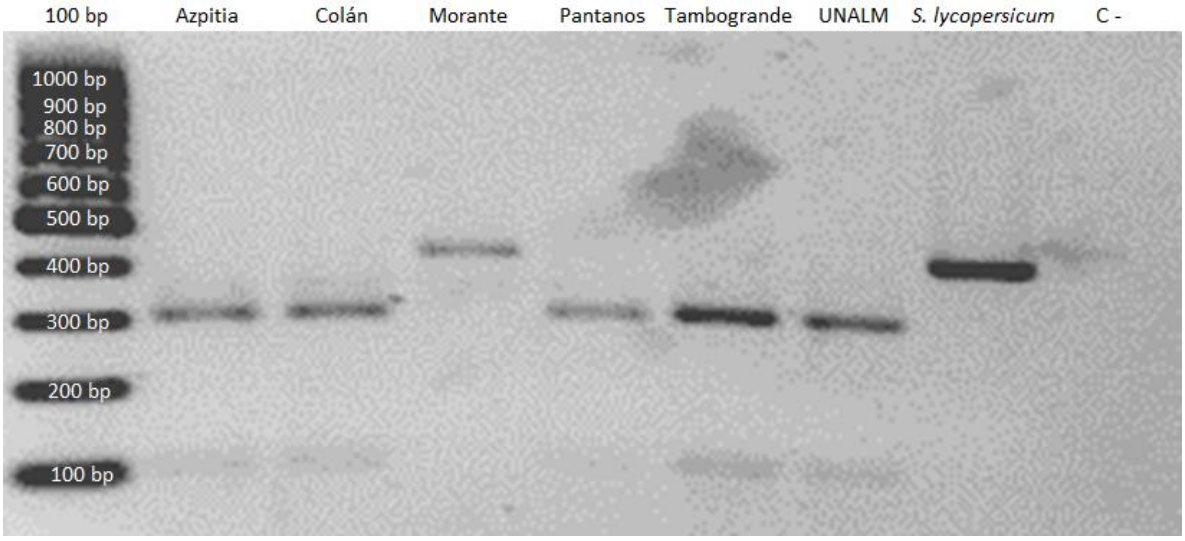
>contig:unspecified:3806640:1:4507:1:3501-4507 contig 3806640

GGTCTGGCTTTCACAAACAACAGATTGCTTGCCTTTGGTATTTGAGTTGGTGTAGTCTTGTTTGCTTGGTTGT
TGTATAAGTTGCTAGTTATTCTTTGTTAGTCAAAGATAATGTAAAATGATGCGGCTGATGTTTGACTGTGCAA
TTGATTTGCTATCAGTCAAGCCAAAGTTGCACTAAATGTTTGGCAGCCAGAGATTGTCCGGGGTAAGCAGAAG
CAGATGGTTGAGCAGTGCAATGTACCTATTGATAACCGTATCCATGCCATTGAGATGGAGCTCAAGCTATGCA
AACAACAAATTCAAGGGTTAGAGAAGGCCCTTGTAAGTTCACATCTGTTTTGTGGAGAATAATGTGGTATTCA
TCTAGTAATTTATGAACTGCATTATGATCTTTCCTTTATATTATTGCAGAGTGTTGAAAAAAAAAGGATGCAG
ACAGCAAAGGAAAAACTGGCTTCAGTAGAATATCACCCCTTGCGGGAATTTAACTTGACAGTCCACCCGGTTG
ATGAAAATGACATGAGAAGGAAAAGACTTAAGAACTCCATCAAGTGTAAACTTCTAAGCTTTT**CTACTCTTTC**
TATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTGAGTTGGGATGGAAAGAATGCA
ACATAATGTCGCTTTTCCAGATTATCAACTTTGTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACAC
CTCCATTCCAAATTTGTTTGACACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGAACG**AAACATTCTATGGTTGAAA**
ATTATTGACTCTTTTTTTTTTTTGGTTGTCACTAACTACATTTTATTACCAAAAGTGTTTCTGTACAGCTCAA
AGGAAAAAAAAACAAAACTCGCTCCTCAACTGGACATGTTTAAGATCACACATTTTGAAAGTATTTGTTTCTT
TCGTAAACTTCGTGTTGGGTCAAACACATGGAATAAATGGAGCCATTGTAATGGAATA

- Resaltado en verde se encuentran los sitios de anclaje para los nuevos cebadores desarrollados.
- La secuencia en letra roja es la secuencia teórica total que va a ser amplificada con los nuevos cebadores (408 pb).
- En negrita se encuentra la secuencia en donde deberían anclar los cebadores del marcador dTG63.
- Resaltada en amarillo se encuentra la secuencia correspondiente a la amplificación de dTG63 (235 pb, aunque se esperaba un tamaño de 246 pb).
- Resaltado en turquesa se indica un sitio de corte que sería reconocido por la enzima *Hinf*I.

Se verificó la amplificación de esta región más extensa en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas y se realizó una digestión con la enzima *Hinf*I, que debía generar dos fragmentos de 304 y 104 pb.

Figura S.1 Amplificación región que contiene al marcador CAPS dTG63 y corte enzimático con la enzima *Hinf*I



Gel de agarosa al 1.5%, 85 V durante 40 minutos con un marcador de 100 pb.
En cada carril se cargó un volumen de 10 µL de producto de PCR

La Figura S.1 muestra que la secuencia fue correctamente amplificada y que la digestión produjo los fragmentos esperados, excepto en las muestras de Morante y de *S.* lycopersicum que carecen de sitio de restricción para *Hinf*I.

Anexo 4: Secuencias de dTG63 obtenidas a partir del secuenciamiento de dTG63-M

*En rojo se muestran las regiones de anclaje para los cebadores dTG63 desarrollados por M. Mustchler

Solanum pimpinellifolium		*Solanum lycopersicum*
Secuencias 5'→3'		Secuencias 5'→3'
Azpitia	Pantanos de Villa	Río Grande
235 pb	235 pb	246 pb
CTACTCTTTCTATGCAATTTGAA **TTG**TTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGG ATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGCTTTTCCAGATTATCAACTTT GTTTTTCCATGATGCATAATCTA AGTGGATATCAAGTACACCTCCA TTCCAAATTTGTTTGACACTATT TCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA ACG**AAACATTCTATGGTTGAAAA** **TTATT**	**CTACTCTTTCTATGCAATTTGA** **ATTG**TTATTTTTCAGGAAAAAG CAAATGCCTGTTTACCTGAGTT GGGATGGAAAGAATGCAACATA ATGTCGCTTTTCCAGATTATCA ACTTTGTTTTTCCATGATGCAT AATCTAAGTGGATATCAAGTAC ACCTCCATTCCAAATTTGTTTG ACACTATTTCCCTAATAGTATG TCCCAAAGAACG**AAACATTCTA** **TGGTTGAAAATTATT**	**CTACTCTTTCTATGCAATTTGAA** **TTG**TTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGG ATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATT ATCAACTTTGTTTTTCCATGATG CATAATCTAAGTGGATATCAAGT ACACCTCCATTCCAAATTTGTTT GACACTATTTCCCTAATAGTATG TTCCAAAAAGAACG**AAACATTCT** **ATGGTTGAAAATTATT**
Colán	Tambogrande	Iron Lady
235 pb	235 pb	246 pb
CTACTCTTTCTATGCAATTTGAA **TTG**TTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGG ATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGCTTTTCCAGATTATCAACTTT GTTTTTCCATGATGCATAATCTA AGTGGATATCAAGTACACCTCCA TTCCAAATTTGTTTGACACTATT TCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA ACG**AAACATTCTATGGTTGAAAA** **TTATT**	**CTACTCTTTCTATGCAATTTGA** **ATTG**TTATTTTTCAGGAAAAAG CAAATGCCTGTTTACCTGAGTT GGGATGGAAAGAATGCAACATA ATGTCGCTTTTCCAGATTATCA ACTTTGTTTTTCCATGATGCAT AATCTAAGTGGATATCAAGTAC ACCTCCATTCCAAATTTGTTTG ACACTATTTCCCTAATAGTATG TCCCAAAGAACG**AAACATTCTA** **TGGTTGAAAATTATT**	**CTACTCTTTCTATGCAATTTGAA** **TTG**TTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGG ATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATT ATCAACTTTGTTTTTCCATGATG CATAATCTAAGTGGATATCAAGT ACACCTCCATTCCAAATTTGTTT GACACTATTTCCCTAATAGTATG TTCCAAAAAGAACA**AAACATTCT** **ATGGTTGAAAATTATT**
Morante	UNALM	GeneBank
246 pb	235 pb	246 pb
CTACTCTTTCTATGCAATTTGAA **TTG**TTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGG ATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATT ATCAACTTTGTTTTTCCATGATG CATAATCTAAGTGGATATCAAGT ACACCTCCATTCCAAATTTGTTT GACACTATTTCCCTAATAGTATG TTCCAAAAAGAATG**AAACATTCT** **ATGGTTGAAAATTATT**	**CTACTCTTTCTATGCAATTTGA** **ATTG**TTATTTTTCAGGAAAAAG CAAATGCCTGTTTACCTGAGTT GGGATGGAAAGAATGCAACATA ATGTCGCTTTTCCAGATTATCA ACTTTGTTTTTCCATGATGCAT AATCTAAGTGGATATCAAGTAC ACCTCCATTCCAAATTTGTTTG ACACTATTTCCCTAATAGTATG TCCCAAAGAACG**AAACATTCTA** **TGGTTGAAAATTATT**	**ATACTCTTTCTATGCAATTTGAA** **TTG**TTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGG ATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGTAGGAGAGGCTTTTCCAGATT ATCAACTTTGTTTTTCCATGATG CATAATCTAAGTGGATATCAAGT ACACCTCCATTCCAAATTTGTTT GACACTATTTCCCTAATAGTATG TTCCAAAAAGAACG**AAACATTCT** **ATGGTTGAAAATTATT**
SolGenomics		
235 pb		
CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCA AATGCCTGTTTACCTGAGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGT CGCTTTTCCAGATTATCAACTTTGTTTTTCCATGATGCATAATCTA AGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGACACTATT TCCCTAATAGTATGTCCCAAAGAACG**AAACATTCTATGGTTGAAAA** **TTATT**		

Anexo 5: Alineamiento de secuencias dTG63-M utilizando Clustal Omega

```
Nombre       Esp.                                Secuencia
GeneBank     (S.l.) ATACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
Iron Lady    (S.l.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
Morante      (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
Río Grande   (S.l.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
Azpitia      (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
Colán        (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
P. de Villa  (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
Tambogrande  (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
UNALM        (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
SolGenomics  (S.p.) CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTGTTATTTTTCAGGAAAAAGCAAATGCCTGTTTACCTG
                     ************************************************************

GeneBank     (S.l.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTCGTAGGAGAGGCTTTTCCAGATTATCAACTTT
Iron Lady    (S.l.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTCGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATTATCAACTTT
Morante      (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTCGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATTATCAACTTT
Río Grande   (S.l.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTCGTAGGAGTGGCTTTTCCAGATTATCAACTTT
Azpitia      (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTC---------GCTTTTCCAGATTATCAACTTT
Colán        (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTC---------GCTTTTCCAGATTATCAACTTT
P. de Villa  (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTC---------GCTTTTCCAGATTATCAACTTT
Tambogrande  (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTC---------GCTTTTCCAGATTATCAACTTT
UNALM        (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTC---------GCTTTTCCAGATTATCAACTTT
SolGenomics  (S.p.) AGTTGGGATGGAAAGAATGCAACATAATGTC---------GCTTTTCCAGATTATCAACTTT
                    ********************************         **********************

GeneBank     (S.l.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
Iron Lady    (S.l.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
Morante      (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
Río Grande   (S.l.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
Azpitia      (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
Colán        (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
P. de Villa  (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
Tambogrande  (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
UNALM        (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
SolGenomics  (S.p.) GTTTTTCCATGATGCATAATCTAAGTGGATATCAAGTACACCTCCATTCCAAATTTGTTTGA
                    ************************************************************

GeneBank     (S.l.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTTCCAAAAAGAACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
Iron Lady    (S.l.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTTCCAAAAAGAACAAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
Morante      (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTTCCAAAAAGAATGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
Río Grande   (S.l.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTTCCAAAAAGAACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
Azpitia      (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA--ACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
Colán        (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA--ACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
P. de Villa  (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA--ACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
Tambogrande  (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA--ACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
UNALM        (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA--ACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
SolGenomics  (S.p.) CACTATTTCCCTAATAGTATGTCCCAAAGA--ACGAAACATTCTATGGTTGAAAATTATT
                    ********************** ***** *  *  *************************
```

- Dentro de especie: S.p.=*Solanum pimpinellifolium*; S.l.=*Solanum lycopersicum*.
- En verde se resaltan sitios en los que ha habido deleción o inserción de nucleótidos.
- En celeste se resaltan sitios en los que ha habido mutación de nucleótidos.
- Subrayados están los nucleótidos que especulamos fueron parte del sitio de restricción para *Hinf*I (5'-G'ANTC-3').
- En rojo se encuentra el nucleótido del sitio de restricción de *Hinf*I que asumimos ha mutado (T→A).

Anexo 6: Generación de cebadores para el gen *Ph-3*

Se cuenta con la secuencia proteica (GeneBank: AIB02970.1) y de nucleótidos (GeneBank: KJ563933) del gen Ph-3, así que se analizó de la manera descrita por Zhang *et al.* (2014).

Para la secuencia proteica:

MADILLTAVVNKSVEIAANLLVQEGTRLHWLREDIDWLQREMRHIRSYVDDAKAKEVGGDSRVKNLLEDIQQL
AGDVEDLLDEFLPKIQQSNKFICCLKTVSFADKFAMEIEKIKRRVADIDRVRTTYNITDTSNNNDDCIPMDRR
RRFLHANDETEVIGLDHDFNKLQHKLLLQDLPYGVVSIVGMPGLGKTTLAKKLYRHVRHQFECSGLVYVSQQP
RAGEILLNIAKQVGLTEEERKENLEHNLRSLLKIKRYVILLDDIWDVEIWDDLKLVLPESDSKIGSRIIITSR
NSNVGRYIGGDFSIHELQPLDSENSFELFTKKICNFVDDNWANTSPDLVNIGRCIVERCGGIPLAIVVTAGML
RARGRTEHAWNRVLDSMTHKIQEGCAKVLALSYNDLPIALRPCFLYFGLFPEDHEIRAFDLINMWIAEKLIVV
NSGNTREAESKAEDFLNDLVSRNLIQVAKRRYDGRISTCRIHDLLHSLCVELGKESNFFHTEHNAFGDPGNVS
RVRRITFYSDINAMNEFLRSNPNPKKLRALFCFIGDSCLFSQLARHDFKLLQVLVVVIAYDYFLSYMGIPNTF
GKTSCLRYLQLEGNMRGKLPNSMVKHMQTLNIENSCTELPTVVWESKQLRHVRYRVGFEASNCCFSISRKIYS
LPPNNIQTLMCVYDKFVEQILFHRLINLRKLGLWIVSDFTVQILSTLPKELEDLKLIFSCQPSEQMNLSSYPY
IVKLHLSGNVHLNSVTFPPNLVKLTLRLIMVEGYVVALLKKLSKLRILKMIWCKHKEEKMDLSGDGDSFLQLE
VLYIQEPSGLSEVECTDDVSMPKLKKLLLKEIPNSNLRLSKRLAKLRV

En azul se ha resaltado la cola enrollada (CC), en negro la región de unión a nucleótidos (NBS) y en rojo región rica en leucinas (LRR).

Se busca generar cebadores para la región rica en leucinas (la más variable de las tres regiones). Utilizando el programa en línea Primer3 (v2.3.6) se diseñó cebadores dentro de la LRR del gen Ph-3:

Tabla S.3 Cebadores desarrollados para amplificar parte de la región LRR de Ph-3

Nombre	Secuencia 5'→3'
Ph-3 Forward	5'-GGTGCGAAGGATTACATTCTACTC-3'
Ph-3 Reverse	5'-CGACAAGTTCATTTGCTCACTCG-3'

La región de nucleótidos de LRR es la siguiente:

TGTCGCATACATGACTTGTTACATAGTTTGTGTGTGGAGTTGGGCAAGGAAAGTAACTTCTTTCACACCGAGCACAATGCA
TTTGGTGATCCCGGCAATGTTTCTAGGGTGCGAAGGATTACATTCTACTCTGATATTAATGCCATGAATGAGTTCCTCCGT
TCAAATCCTAATCCTAAGAAACTTCGTGCACTTTTCTGTTTTATAGGTGATAGTTGCCTATTTTCTCAACTGGCTCGTCAT
GACTTCAAATTATTGCAAGTGTTGGTTGTAGTCATAGCTTATGATTATTTTTTAAGTTACATGGGAATCCCAAACACGTTT
GGGAAGACGAGTTGCTTACGCTATCTGCAATTGGAGGGGAATATGCGTGGGAAATTGCCAAATAGTATGGTCAAACATATG
CAGACCCTAAATATTGAAAATAGCTGCACTGAACTTCCTACTGTTGTTTGGGAGTCTAAACAATTGAGACATGTTCGTTAT
AGAGTTGGTTTTGAAGCATCTAACTGTTGCTTTTCGATAAGCCGAAAAATTTACTCATTGCCTCCTAATAATATACAAACT
TTGATGTGTGTGTATGATAAGTTTGTTGAACAGATATTATTTCACCGGTTGATCAACTTAAGAAAACTGGGTCTATGGATA
GTATCAGATTTCACCGTTCAGATATTGTCAACATTGCCAAAAGAGTTGGAGGATCTGAAGCTCATATTTTCGTGTCAACCG
AGTGAGCAAATGAACTTGTCGTCCTATCCATATATTGTTAAGTTGCATTTGAGCGGAAACGTGCATTTGAACTCTGTTACA
TTCCCTCCAAATCTCGTCAAGCTTACTCTTCGCTTAATTATGGTAGAGGGTTATGTAGTGGCATTGCTTAAGAAATTGTCC
AAATTAAGAATACTTAAAATGATTTGGTGCAAACATAAGGAAGAAAAGATGGATCTCTCTGGTGATGGTGATAGCTTTCTG
CAACTTGAAGTTCTGTATATTCAAGAACCATCCGGGTTGTCTGAAGTAGAGTGCACAGATGATGTGAGTATGCCTAAATTG
AAAAAGCTATTACTTAAAGAAATACCTAATTCCAACCTTAGGCTCTCGAAACGTCTTGCAAAGCTGAGAGTA

Resaltadas están las zonas de anclaje de los cebadores diseñados, y en rojo la secuencia a amplificar (643 pb).