

Artículo científico

Haplotipos mitocondriales de *Phytophthora andina* de tomate de árbol en el Ecuador

Mitochondrial haplotypes of Phytophthora andina in Ecuador

Diana Flores-Garcés^{1,2}, Gabriela Chacón¹ y María Eugenia Ordóñez^{1*}

¹ Fungario QCAM, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

² Centro de Investigación de la Biodiversidad y Cambio Climático, Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito, Ecuador.

* meordonez@puce.edu.ec

<https://doi.org/10.26807/remcb.v40i2.764>

Recibido 28-03-2019; Aceptado 01-04-2019

RESUMEN.- Se determinó el haplotipo mitocondrial de 131 aislamientos puros de *Phytophthora andina* colectados de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en varias provincias del Ecuador. Se amplificaron las regiones P2 y P4 del ADNmt, y los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción MspI y EcoRI. Todos los aislamientos analizados mostraron un patrón de bandas correspondiente al haplotipo Ia para *P. infestans*, es decir, bandas de tamaño 720 y 350 pb con MspI (región P2) y bandas de tamaño 394, 361 y 309 pb con EcoRI (región P4). Sin embargo, también se observó de forma consistente en todos los aislamientos analizados bandas adicionales que no han sido reportadas anteriormente. Para la región P2 se obtuvieron bandas adicionales de 400 y 500 pb y un fragmento no digerido de 1070 pb, y para la región P4 bandas adicionales de 603 y 755 pb además de un fragmento no digerido de 964 pb. El encontrar un patrón nuevo de bandas de manera consistente para todos los aislamientos de *P. andina* analizados sugiere que la descripción del haplotipo Ia asignado a *P. andina* de tomate de árbol debería ser redefinido.

PALABRAS CLAVE: ADN mitocondrial, enzimas de restricción, *Solanum betaceum*, tizón.

ABSTRACT.- The mitochondrial DNA haplotype of 131 pure cultures of *Phytophthora andina* collected from tree tomato (*Solanum betaceum*) in several provinces in Ecuador was determined. The P2 and P4 regions of the mtDNA were amplified, and the PCR products obtained were digested with MspI and EcoRI restriction enzymes. All isolates analyzed showed a band pattern corresponding to the Ia haplotype for *P. infestans*, that is, bands of sizes 720 and 350 bp with MspI (P2 region) and bands of sizes 394, 361 and 309 bp with EcoRI (P4 region). However, additional bands that have not been reported previously were also consistently observed in all isolates analyzed. For the P2 region, additional bands of 400 and 500 bp and an undigested fragment of 1070 bp were obtained, and for the P4 region, additional bands of 603 and 755 bp in addition to an undigested fragment of 964 bp. Finding new band patterns in a consistent manner for all analyzed isolates of *P. andina* suggests that the description of haplotype Ia assigned to *P. andina* from tree tomato should be redefined.

KEYWORDS: Blight, mitochondrial DNA, *Solanum betaceum*, restriction enzymes.

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un cultivo nativo del Sudamérica, bastante extendido en todas las provincias de la Sierra y Amazonía del Ecuador, de alta rentabilidad y con propiedades organolépticas deseables (Bohs 2007; Morales 2002; ESPAC 2016). Este cultivo es de gran importancia económica para pequeños y medianos agricultores del Ecuador, con una producción en el 2016 de 28 500 t (ESPAC 2016). Tradicionalmente, la mayor producción se ha concentrado en las provincias de Tungurahua e Imbabura.

Una de las principales enfermedades del cultivo es el tizón, presente en todas las zonas tomateras del Ecuador (Revelo et al. 2004a, Revelo et al. 2004b). El agente causal es *Phytophthora andina*, que ha sido reportada únicamente en los Andes y fue descrita en base a colecciones y estudios realizados en el Ecuador (Ordoñez et al. 2000; Adler et al. 2004; Chacón Acosta 2007; Oliva et al. 2010). También puede atacar al pepino dulce (*S. muricatum*) y la naranjilla (*S. quitoense*), así como a especies silvestres de la sección *Anarrhichomenum* de *Solanum* (Oliva et al. 2010; Forbes et al. 2013, 2016). *Phytophthora andina* ataca los tejidos del ápice, hojas y tallos de las plantas jóvenes, y follaje y ramillas en las plantas adultas (Revelo et al. 2004b), ocasiona defoliación severa y afecta seriamente la producción si no se toman medidas de control (Revelo et al. 2004a). En un principio, el patógeno fue identificado como *P. infestans* (el tizón tardío de la papa), pero análisis genéticos determinaron que era una especie nueva resultado de la posible hibridación entre *P. infestans* y otra especie aún no identificada de *Phytophthora* (Kroon et al. 2004; Gómez-Alpizar et al. 2008; Oliva et al. 2010; Goss et al. 2011; Martin et al. 2014). Recientemente, el agente causal de tizón en tomate de árbol en Colombia ha sido descrito como *P. betacei* (Mideros et al. 2018), mientras que en Perú se ha determinado que es *P. andina*. (Forbes et al. 2016).

Se han desarrollado varios marcadores fenotípicos y genéticos para caracterizar e identificar las diferentes poblaciones de *P. infestans*, como son polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del genoma nuclear, tipos de apareamiento, haplotipos mitocondriales (ADNmt), patrones enzimáticos y más recientemente microsatélites (Waterhouse 1963; Galindo y Hohl 1985; Griffith y Shaw 1998; Ordoñez et al. 2000; Flier et al. 2002; Adler et al. 2004; Gómez-

Alpizar et al. 2008; Oliva et al. 2010; Goss et al. 2011; Blair et al. 2012; Forbes et al. 2012, 2016; Mideros et al. 2018; Martin et al. 2019). En base a estos mismos marcadores se han caracterizado a las poblaciones de *Phytophthora* en tomate de árbol. Así, se ha reportado en Colombia para *P. betacei* el linaje EC-3 en base a RFLPs, tipo de apareamiento A1 y haplotipo mitocondrial Ia (Mideros et al. 2018), para *P. andina* en Perú el linaje PE-8, tipo de apareamiento A2 y haplotipo mitocondrial Ic, (Forbes et al. 2016) y para *P. andina* en Ecuador el linaje EC-3, tipo de apareamiento A1 y haplotipo mitocondrial Ia (Oliva et al. 2010).

El empleo de marcadores moleculares de fácil uso, bajo costo y eficaces en distinguir las poblaciones del patógeno son indispensables para el estudio y manejo de la enfermedad. La población ecuatoriana de *P. andina* de tomate de árbol fue descrita por última vez en el 2010 (Oliva et al., 2010), y desde entonces no se ha realizado un análisis exhaustivo de la población. En esta investigación se reporta un posible nuevo haplotipo mitocondrial para

P. andina en base a muestras colectadas en tomate de árbol en el 2018 en el Ecuador, obtenido tras la amplificación de las regiones P2 y P4 de ADN mitocondrial, y la respectiva digestión con las enzimas de restricción MspI y EcoR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos puros de 131 aislamientos de *P. andina* obtenidos de hojas infectadas de *S. betaceum* de 21 localidades en el Ecuador fueron multiplicados en cajas petri con agar centeno A (Caten y Jinks, 1968). El micelio fue recogido de la superficie de la caja con un asa bacteriológica previamente esterilizada y, se colocó en microtubos de 1.5 mL. El ADN genómico total fue extraído usando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Cat. # A1125), según las especificaciones del fabricante. La concentración de ADN (ng/μL) de cada muestra fue cuantificada usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y el programa ND-1000 V3.7.1 (Thermo Fisher Scientific).

Dos regiones específicas del ADN mitocondrial denominadas P2 (1070 pb) y P4 (964 pb) (Griffith y Shaw, 1998) fueron amplificadas por separado, utilizando 15 ng de ADN y las siguientes condiciones (concentraciones finales): 1X PCR Buffer, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.2 mM, 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Cat. # 10966-030 y # R0181) y 0.325 μM por cada cebador en volúmenes de 20

Tabla 1.-Aislamiento ecuatoriano de *Phytophthora andina* de tomate de árbol

PROVINCIA	LOCALIDAD	NÚMERO DE AISLAMIENTOS
Azuay	Bulán, Don Julo, Tomebamba	25
Imbabura	San Isidro, Zuleta	10
Napo	Baeza, Conduija, Linares	15
Pichincha	Canchacoto, Guayllabamba, Illolán1, Illolán2, Nanegalito, Tandapi	42
Tungurahua	Izamba, Pillaro, Runtún1, Runtún2, Runtún4, Runtún5, San Francisco	39

μL. Los cebadores empleados fueron, en sentido 5'-3': P2, F2: TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT, R2: TTACGGCGGTTTAGCACATACA; P4, F4: TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT, R4: CCGATACCGATACCAGCACCAA) (Griffith y Shaw 1998). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies), con los siguientes parámetros: 94 °C por 3 minutos, seguido de 27 ciclos de 92 °C por 30 segundos, 60 °C por 50 segundos, 72 °C por 1 minuto y 10 segundos y, finalmente, 72 °C por 5 minutos. Se confirmó la amplificación de las regiones P2 y P4 mediante electroforesis de los productos en un gel de agarosa al 1.5 % preparado en TBE 0.5X y teñido con Syber® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Cat. # S33102). Luego, los productos de PCR (16 μL) de la región P2 fueron digeridos con 2 U de enzima de restricción Anza™ 65_MspI (Thermo Fisher Scientific, Cat. # IVGN0656), mientras que los productos de la región P4 (16 μL) fueron digeridos con 2 U de enzima de restricción Anza™ 11_EcoRI (Thermo Fisher Scientific, Cat. # IVGN0116) según las especificaciones del fabricante, en un termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet International) a 37 °C por 2 horas. Los productos de digestión fueron visualizados en un gel de agarosa al 2 % preparado en TBE 0.5X y teñido con Syber® Safe DNA Gel Stain, según las especificaciones del fabricante. La electroforesis de los productos de digestión se llevó a cabo en una cámara horizontal (Enduro™ 96,

Labnet International) a 100 V, 50 mA por 1 hora 30 min en buffer TBE 0.5X. Se documentó el tamaño de banda de los productos de digestión con el equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad). Los tamaños de banda se calcularon según el marcador TrackIt™ 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Cat. # 10488058) y el programa Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad). Los resultados fueron comparados con lo reportado para los haplotipos mitocondriales Ia, Ib, IIa, IIb (Carter et al. 1990; Griffith y Shaw 1998) y Ic (Ordoñez 2000; Flier et al. 2002; Oliva et al. 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 131 aislamientos de *P. andina* analizados presentaron fragmentos de digestión cuyo tamaño concuerda con lo reportado para el haplotipo mitocondrial Ia de *P. infestans* en las regiones P2 y P4 del ADNmt (Griffith y Shaw 1998): 720 y 350 pb para P2, y 394, 361 y 209 pb para P4 (Figura 1). Sin embargo, los productos de PCR de la región P2 digeridos con la enzima MspI, presentaron de forma consistente fragmentos adicionales de 400 pb y 500 pb y un fragmento no digerido de 1070 pb (Figura 1A). Así mismo, los productos de PCR de la región P4 digeridos con la enzima EcoRI presentaron fragmentos adicionales de 603 pb y 755 pb, así como un fragmento no digerido de 964 pb (Figura 1B).

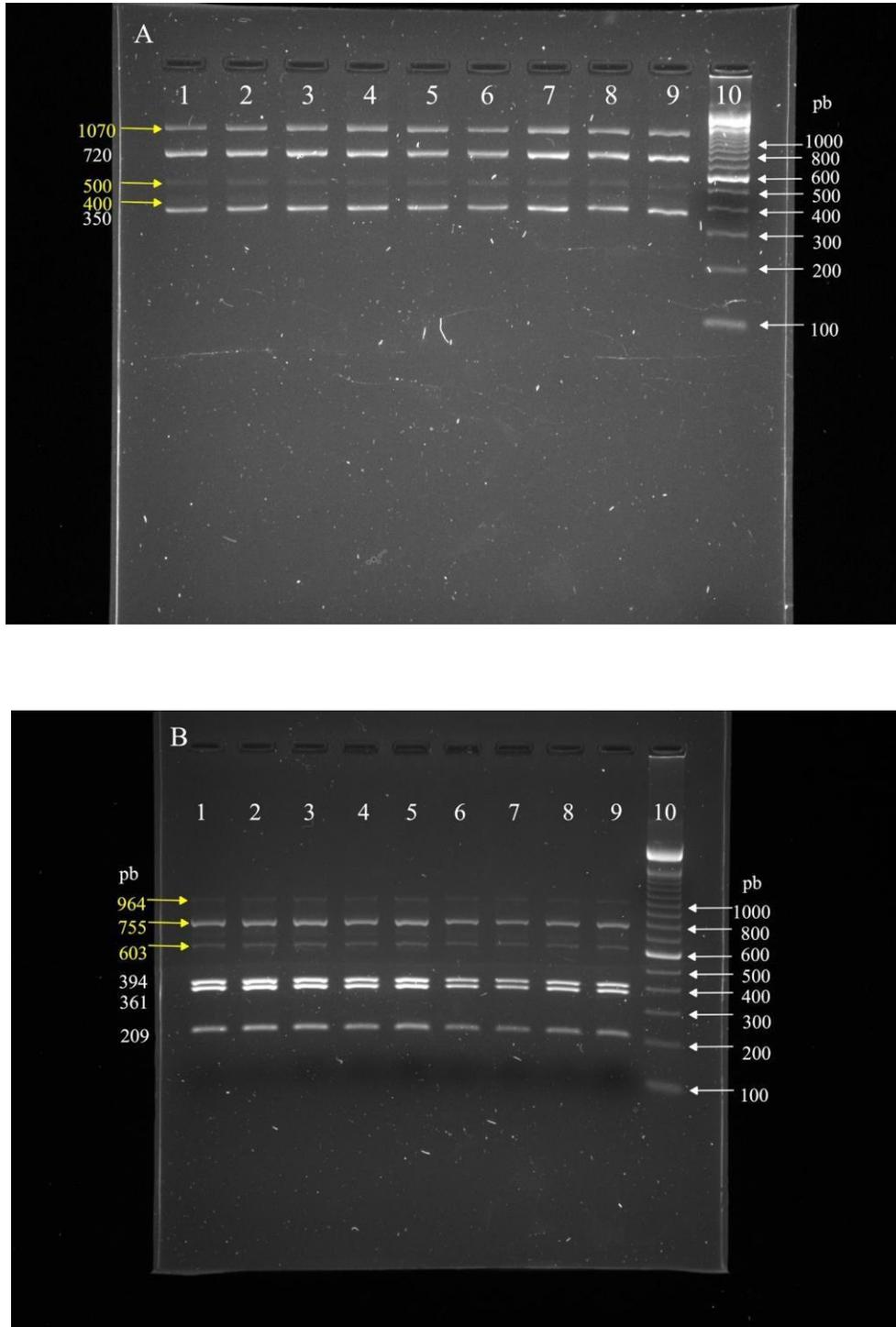


Figura 1. Haplotipos mitocondriales de las regiones P2 y P4 de *P. andina* de tomate de árbol. 1A. Fragmentos de digestión de la región P2 con MspI. 1B. Fragmentos de digestión de la región P4 con EcoRI. El orden de las muestras es la misma para 1A y 1B, para cada columna se indica la provincia y localidad. Columna 1, 2 y 3: Napo, Linares; Columna 4 y 5: Tungurahua, San Francisco; Columna 6 y 7: Pichincha, Nanegalito; Columna 8: Azuay, Tomebamba; Columna 9: Azuay, Don Julio; Columna 10: TrackIt™ 100 bp DNA ladder. Bandas adicionales en amarillo.

La determinación de los haplotipos mitocondriales en *P. infestans* y *P. andina* tiene su base en la metodología de Griffith y Shaw (1998), en el que los cebadores utilizados fueron desarrollados para la caracterización de *P. infestans*. La mayor parte de estudios sobre la caracterización de *P. andina* no incluyen imágenes de los distintos haplotipos mitocondriales encontrados ni se reportan los tamaños de bandas obtenidos, a excepción de la investigación de Forbes et al. (2016), que en la información suplementaria muestra el patrón de bandas característico del haplotipo mitocondrial Ia de *P. andina* de tomate de árbol con MspI. Allí también se observan bandas adicionales leves de 400 y 1070 pb, similares a las encontradas en el presente trabajo. Estas bandas adicionales también se las puede observar en Ordoñez et al. (2000), donde se documenta el patrón de bandas característico de P2 con MspI para los haplotipos mitocondriales Ia de *P. infestans* y Ic de aislamientos que en ese entonces fueron considerados como *P. infestans* sensu lato, pero que posteriormente fueron clasificados como *P. andina* (Adler et al. 2004; Oliva et al. 2010).

Hasta donde se tiene conocimiento, no existen trabajos publicados sobre *P. andina* proveniente de tomate de árbol en los que se reporte los haplotipos mitocondriales en la región P4 del ADNmt utilizando EcoRI. Este trabajo sería el primer reporte de este tipo, y que documenta bandas adicionales a lo previamente descrito para este patógeno de *S. betaceum* (Adler et al. 2004; Oliva et al. 2010; Forbes et al. 2016; Mideros et al. 2018).

La presencia de bandas adicionales en los haplotipos de *P. andina* de tomate de árbol, además de los registrados para *P. infestans*, se podría explicar por la existencia de sitios de restricción adicionales en las regiones P2 y P4 del ADNmt. Esto tendría coherencia con la postulación de que *P. andina* es un producto de hibridación entre *P. infestans* y otra especie desconocida de *Phytophthora* (Goss et al. 2011, Martin et al. 2015). Así, el sitio de anclaje de los cebadores y los sitios de restricción de las enzimas pudieran variar, ya que originalmente éstos fueron diseñados para *P. infestans*.

Análisis recientes de cinco loci del genoma mitocondrial de *P. infestans* (Martin et al. 2019), donde se incluyó en el estudio una muestra de *P. andina* de tomate de árbol del Ecuador, evidenció la presencia de 37 diferentes haplotipos mitocondriales en *P. infestans* y un haplotipo único para la muestra de *P. andina*. Esos autores reconocen que su técnica no es práctica para estudios

poblacionales con un número grande de muestras, ya que el tiempo y los costos son elevados. El hecho de que bandas adicionales se presenten de manera consistente en todos los aislamientos de *P. andina* de tomate de árbol analizados en este estudio, mediante técnicas rápidas y económicas, sugiere que estas bandas deberían ser consideradas para la descripción de un nuevo haplotipo mitocondrial en *P. andina* de tomate de árbol que difiere del Ia de *P. infestans*.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a Erika Caicedo y Eduardo Atiencia por la colección y aislamiento de muestras de *P. andina*. Este trabajo fue financiado con fondos de investigación de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador QINV0040.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler NE, Erselius LJ, Chacn MG, Flier WG, Ordoñez ME, et al. 2004. Genetic diversity of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology*. 94:154–162.
- Blair JE, Coffey MD, Martin FN. 2012. Species tree estimation for the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, and close relatives. *PLoS One*. 7, e37003.
- Bohs L. 2007. Phylogeny of the Cyphomandra Clade of the Genus *Solanum* (Solanaceae) Based on ITS Sequence Data. *Taxon*. 56(4):1012. doi:10.2307/25065901
- Caten C, Jinks J. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Canadian Journal of Botany*. 46(4):329-348. <https://doi.org/10.1139/b68-055>
- Carter DA, Archer SA, Buck KW. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycol. Res*. 94:1123-1128.
- Chacón Acosta MG. 2007. Variability of *Phytophthora infestans sensu lato* in the highland tropics of Ecuador. Zurich, Switzerland: Swiss Federal Institute of Technology Zurich, PhD thesis.
- Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC 2016. (2016). Instituto Nacional

de Estadística y Censos – INEC. Recuperado de: <http://www.ecuadoren cifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

Flier WG, Grunwald NJ, Kroon LPNM, van den Bosch GBM, Garay-Serrano E, et al. 2002 *Phytophthora ipomoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipedunculata* in the Toluca Valley of central Mexico. *Mycological Research*. 106:848-856.

Forbes GA, Ristaino JB, Oliva RF, Flier W. 2012. A rebuttal to the letter to the editor concerning 'Defining species boundaries in the genus *Phytophthora*: the case of *Phytophthora andina*'. *Plant Pathology*. 61:221–223.

Forbes GA, Morales JG, Restrepo S, et al. 2013. *Phytophthora infestans* and *Phytophthora andina* on Solanaceous hosts in South America. In: Lamour K (ed), *Phytophthora: a global perspective*: 48–58. CABI Plant Protection Series, No. 2, UK.

Forbes GA, Gamboa S, Lindqvist-Kreuz H, Oliva RF, Perez W. 2016. Identification of an A2 population of *Phytophthora andina* attacking tree tomato in Peru indicates a risk of sexual reproduction in this pathosystem. *Plant Pathology*. 65(7):1109-1117. doi:10.1111/ppa.12531

Galindo J, Hohl HR. 1985. *Phytophthora mirabilis*, a new species of *Phytophthora*. *Sydowia* 38:87-96.

Gomez-Alpizar L, Hu CH, Oliva R, et al. 2008. Phylogenetic relationships of *Phytophthora andina*, a new species from the highlands of Ecuador that is closely related to the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Mycologia*. 100:590–602.

Goss EM, Cardenas ME, Myers K, et al. 2011. The plant pathogen *Phytophthora andina* emerged via hybridization of an unknown *Phytophthora* species and the Irish potato famine pathogen, *P. infestans*. *PLoS One*. 6:e24543.

Griffith GW, Shaw DS. 1998. Polymorphism in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10):4007-4014.

Kroon L, Bakker F, Vanden Bosch G, Bonants P, Flier W. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA

sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 41(8):766-782. doi:10.1016/j.fgb.2004.03.007

Martin FN, Blair JE, Coffey MD. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology*. 66: 9–32.

Martin MD, Vieira FG, et al. 2015. Genomic characterization of a South American *Phytophthora hybrid* mandates reassessment of the geographic origins of *Phytophthora infestans*. *Mol. Biol. Evol.* 33(2):479-491. doi:10.1093/molbev/msv241

Martin, F. N., Zhang, Y., Cooke, D. E., Coffey, M. D., Grünwald, N. J., Fry, W. E. 2019. Insights into evolving global populations of *Phytophthora infestans* via new complementary mtDNA haplotype markers and nuclear SSRs. *PloS One*. 14(1), e0208606.

Mideros MF, Turissini DA, Guayazán N, Ibarra-Avila H, Danies G, et al. 2018. *Phytophthora betacei*, a new species within *Phytophthora* clade 1c causing late blight on *Solanum betaceum* in Colombia. *Persoonia: Molecular phylogeny and evolution of fungi*. 41:39-55.

Morales J. 2002. Diagnóstico agro socio económico del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betacea Sendt.*) en cuatro provincias de la sierra ecuatoriana (Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay). Tesis de Grado Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Oliva RF, Kroon LPNM, Chacón G, et al. 2010. *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology* 59:613–625.

Ordoñez ME, Hohl HR, Velasco JA, Ramon MP, Oyarzun PJ, et al. 2000. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans*, attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology*. 90:197-202. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.2.197.

Revelo J, Mora E, Reyes M. 2004a. Comportamiento de genotipos comerciales de tomate de árbol a las enfermedades nudo de la raíz, antracnosis del fruto, tizón tardío y mancha negra del tronco. Plegable de divulgación No. 228. INIAP, Promsa.

Revelo J, Pérez E, Maila MV. 2004b. Cultivo ecológico del tomate de árbol en Ecuador: Texto de consulta del estudiante. Quito, Ecuador: INIAP,

Estación Experimental Santa Catalina/PROMSA/
FONTAGRO.

Waterhouse GM. 1963. Key to the species of
Phytophthora de Bary. Mycological Papers. 92:22.