

QK621
P9R85e

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE MEDICINA

POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

**ESTUDIO GENÉTICO DE LA POBLACIÓN DE *Phytophthora infestans*
(OOMYCETES: PERONOSPORALES) DE LOS ANDES VENEZOLANOS Y SU
APORTE PARA EL ESTUDIO DE PATÓGENOS HUMANOS
PERTENECIENTES AL GÉNERO *Pythium* (OOMYCETES: PYTHIALES)**

www.bdigital.ula.ve

AUTORA: Lic. Romina Rocio Ruiz Arellano

TUTOR: Dr. Gustavo Alberto Fermin Muñoz

Mérida, 2014

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**ESTUDIO GENÉTICO DE LA POBLACIÓN DE *Phytophthora infestans*
(OOMYCETES: PERONOSPORALES) DE LOS ANDES VENEZOLANOS Y SU
APORTE PARA EL ESTUDIO DE PATÓGENOS HUMANOS
PERTENECIENTES AL GÉNERO *Pythium* (OOMYCETES: PYTHIALES)**

www.bdigital.ula.ve

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR LA
LICENCIADA EN BIOLOGÍA ROMINA ROCIO RUIZ
ARELLANO, CI: 18 123 593, ANTE EL CONSEJO DE
LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO
CREDENCIAL DE MÉRITO PARA LA OBTENCIÓN
DEL GRADO DE *MAGISTER SCIENTIAE* EN
CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

AUTORA: Romina Rocio Ruiz Arellano

Licenciada en Biología, Universidad de Los Andes (ULA)

TUTOR: Gustavo Alberto Fermin Muñoz

Licenciado en Biología, Universidad de los Andes (ULA)

Magister Scientiae en Ciencias Médicas Fundamentales (ULA)

PhD in Plant Pathology, Cornell University. Ithaca, NY, USA

Profesor Titular de la Universidad de Los Andes (ULA)

AGRADECIMIENTOS

El presente Trabajo es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron una gran cantidad de personas opinando, corrigiendo, asesorando, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad y también, ayudándome económicamente, permitiéndome así lograr esta meta.

En la culminación de este trabajo les recuerdo con mucho cariño, sintiendo el más sincero agradecimiento.

Es importante el reconocimiento a las personas que laboran en el Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad Molecular del Instituto Jardín Botánico de Mérida, lugar donde fue realizado este trabajo, especialmente al Dr. Gustavo Fermin, el cual sirvió como tutor, participando nuevamente en mi progreso académico y personal. También es importante resaltar y agradecer el financiamiento obtenido por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes, bajo el proyecto C-1736-11-01-EM, titulado “Caracterización de la manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans* y un aporte al estudio de la variabilidad genética del patógeno aislado de plantas de papa de Los Andes venezolanos”.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Pythium insidiosum</i>	6
Diagnóstico de la Pitiosis	11
Tratamiento para la Pitiosis	13
<i>Phytophthora infestans</i>	16
Ciclo de vida de <i>P. infestans</i>	19
Mecanismos de infección de <i>P. infestans</i>	28
Hipótesis	41
Objetivos	42
Objetivo general	42
Objetivos específicos	42
MATERIALES Y MÉTODOS	44
I. Análisis del locus <i>B1</i> de <i>Phytophthora infestans</i> de los Andes venezolanos	44
Extracción de ADN	44
Amplificación del locus <i>B1</i>	45
Secuenciación del locus <i>B1</i>	46
Análisis de restricción	47

II. Caracterización de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de tomate del estado Mérida	48
a) Ensayo de infección de folíolos de papa con aislados de <i>Phytophthora infestans</i> proveniente de plantas de tomate del estado Mérida	48
Material vegetal	48
Preparación de las cámaras de inoculación	49
Preparación del Inoculo e inoculación	50
b) Análisis de las secuencias de distintos genes de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> proveniente de plantas de tomate del estado Mérida	51
Amplificación por PCR	51
Secuenciación de los fragmentos amplificados	52
III. Estructura genética de la población de <i>Phytophthora infestans</i> presentes en papas cultivadas en el estado Trujillo y papas nativas del estado Mérida	53
Material biológico	53
Extracción de ADN	54
Tipo de talo	54
Amplificación del locus S1	55
Haplotipo mitocondrial	56
Amplificación por PCR	57

<i>Digestión con MspI</i>	57
<i>Caracterización mediante el uso de microsatélites</i>	58
IV. Marcador candidato: estudio del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i>	60
<i>Material biológico</i>	60
<i>Clonación del gen de la manitol deshidrogenasa de P. infestans</i>	60
<i>Ensayos de expresión de la manitol deshidrogenasa de P. infestans.</i>	65
<i>Secuenciación del gen de la manitol deshidrogenasa de P. infestans</i>	66
<i>Análisis de secuencias y modelado de la manitol deshidrogenasa de P. infestans</i>	67
V. Comparación molecular entre aislados de <i>Phytophthora infestans</i> y <i>Pythium insidiosum</i>	67
<i>Material biológico</i>	67
<i>Amplificación por PCR y análisis del locus B1</i>	67
<i>Caracterización mediante el uso de microsatélites</i>	68
RESULTADOS	70
I. Análisis del locus B1 de <i>Phytophthora infestans</i> de los Andes venezolanos	70
<i>Extracción de ADN total, y amplificación y secuenciación del locus B1</i>	70
<i>Análisis de restricción</i>	72
II. Caracterización de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de tomate del estado Mérida	74

a) Ensayo de infección de folíolos de papa con aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de tomate del estado Mérida	74
b) Análisis de secuencias de distintos genes de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de tomate del estado Mérida	77
III. Estructura genética de la población de <i>Phytophthora infestans</i> presentes en papas cultivadas en el estado Trujillo y papas nativas del estado Mérida	79
<i>Determinación del Tipo de talo</i>	79
<i>Haplotipo mitocondrial</i>	81
<i>Análisis de microsatélites</i>	81
IV. Marcador candidato: estudio del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i>	86
V. Comparación molecular entre aislados de <i>Phytophthora infestans</i> y <i>Pythium insidiosum</i>	95
<i>Amplificación por PCR y análisis del locus B1</i>	95
<i>Caracterización mediante el uso de microsatélites</i>	98
DISCUSIÓN	100
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	120
REFERENCIAS	124
ANEXOS	136

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales géneros de los Oomycetes patogénicos (Kamoun, 2003)	3
Tabla 2. Iniciadores usados para el análisis de secuencia de los aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de tomate del estado Mérida	52
Tabla 3. Microsatélites, secuencias de los cebadores y longitud del producto de PCR reportado para <i>Phytophthora infestans</i> (Knapova <i>et al.</i> , 2001)	59
Tabla 4. Iniciadores usados para el análisis de aislados de <i>Pythium insidiosum</i>	69
Tabla 5. Diámetro de la lesión causada por los aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de papa y tomate inoculados en folíolos de papas	77
Tabla 6. Frecuencia de los alelos microsatelitales encontrados en la población estudiada de <i>Phytophthora infestans</i>	82
Tabla 7. Diferencias fisiológicas y moleculares entre aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de papa y tomate	106

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Miembros del grupo Stramenopiles	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i>	20
Figura 3. Infección por un parásito biotrófico	29
Figura 4. Complejo haustorial de patógenos fúngicos biotróficos	37
Figura 5. Electroforesis de ADN total extraído de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de papa del estado Trujillo	71
Figura 6. Amplificación por PCR del locus <i>B1</i> a partir del ADN total extraído de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de planta de papa y tomate	71
Figura 7. Representación esquemática del alineamiento de las secuencias amplificadas del locus <i>B1</i> de distintos aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de papa y tomate de los Andes venezolanos	73
Figura 8. Productos de la digestión con <i>Taq1</i> y <i>Fnu4H</i> del amplicón del locus <i>B1</i> para distintos aislados de <i>Phytophthora infestans</i>	73
Figura 9. Ensayo de infección en folíolos de papa de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de papa y tomate	75
Figura 10. Ensayo de infección en folíolos de papa de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de papa y tomate	76
Figura 11. Producto de la amplificación de los genes en estudio para	

aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de foliolos de tomate	78
Figura 12. Alineamiento de las secuencias amplificadas de los genes <i>Ras</i> (A) y locus <i>B1</i> (B) de distintos aislados de <i>Phytophthora infestans</i> proveniente de plantas de papa y tomate de los Andes venezolanos	80
Figura 13. Electroforesis de los amplicones de la región <i>S1</i> amplificada a partir de ADN total de aislados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de plantas de papa del estado Trujillo y de las regiones de Gavidia y Moca del estado Mérida	83
Figura 14. Electroforesis de la región <i>P2</i> del genoma mitocondrial de <i>Phytophthora infestans</i> , aislados provenientes de plantas de papa del estado Trujillo y de las regiones de Gavidia y Moca del estado Mérida	83
Figura 15. Electroforesis de la digestión con <i>MspI</i> de los amplicones de la región <i>P2</i> del genoma mitocondrial de <i>Phytophthora infestans</i> , de aislados provenientes de plantas de papa del estado Trujillo y de las regiones de Gavidia y Moca del estado Mérida	83
Figura 16. Patrones de amplificación del locus <i>Pi2H</i>	84
Figura 17. Patrones de amplificación del locus <i>PiG11</i>	84
Figura 18. Patrones de amplificación del locus <i>Pi4G</i>	85
Figura 19. Patrones de amplificación del locus <i>Pi4B</i>	85
Figura 20. Amplificación por PCR del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i>	88

Figura 21. Evidencias de la clonación eficiente del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i>	88
Figura 22. Extractos de proteínas totales del ensayo de expresión de la manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i> en poliacrilamida al 8%.	89
Figura 23. Actividad en geles nativos de la fosfoglucoasa isomerasa (PGI) de <i>Escherichia coli</i>	89
Figura 24. Alineamiento múltiple, realizado en el programa Clustal Omega y visualizado en el programa GeneDoc, de las secuencias del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i> , <i>P. sojae</i> y <i>P. parasítica</i>	92
Figura 25. Filograma obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima manitol deshidrogenasa pertenecientes a distintos grupos de organismos	92
Figura 26. Modelo tridimensional predicho para el monómero de manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i>	93
Figura 27. Análisis de la estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos de la manitol deshidrogenasa de <i>Phytophthora infestans</i>	94
Figura 28. Amplificación por PCR de las regiones génicas de <i>ITS4</i> , manitol deshidrogenasa y locus <i>B1</i>	96
Figura 29. Digestión del amplicón del locus <i>B1</i> de <i>Pythium insidiosum</i>	97

Figura 30. Electroforesis de la amplificación del locus *Pi2H* y *Pi4G* en *Pythium insidiosum* 99

Figura 31. Dendrograma del análisis de la variabilidad de las secuencias de microsatélites de la población de *Phytophthora infestans* estudiada en los estados andinos de Venezuela, donde se incluyen los resultados encontrados para el haplotipo mitocondrial y el análisis del locus *B1* 103

Figura 32. Mecanismo catalítico y modelo de unión al sustrato de la manitol deshidrogenasa de *Cladosporium herbarum* 115

Figura 33. Comparación del mecanismo de infección descrito en ascomicetes patógenos de plantas y animales 119

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Los patógenos animales y vegetales guardan ciertas características en común en cuanto a sus mecanismos de infección y factores de virulencia; al ser más sencillo y viable el estudio de fitopatógenos, se han propuesto varios modelos para el análisis de infecciones en humanos usando patosistemas vegetales de referencia. En este trabajo se propone el estudio del patógeno humano *Pythium insidiosum* usando las técnicas moleculares descritas para el estudio de *Phytophthora infestans*, agente causal de la candelilla o tizón tardío en Solanáceas. Para lograr este objetivo, se presenta un aporte al estudio del fitopatógenos en los estados andinos de Venezuela, proponiendo un nuevo marcador molecular para el análisis poblacional del organismo, por medio de la restricción del locus *B1*; también se completa el estudio ya iniciado de los aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida, y se caracterizan genéticamente los aislados provenientes de plantas de papa de cultivo del estado Trujillo y de papas nativas del estado Mérida, por medio de la determinación del tipo de talo, haplotipo mitocondrial y microsatélites. Adicionalmente, se iniciaron los estudios del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de *P. infestans*, realizando la clonación y análisis de secuencias del gen, y por último se probaron algunos marcadores moleculares utilizados para el estudio de *P. infestans* en aislados de *P. insidiosum*. Se puede afirmar que es posible abordar el estudio de este patógeno humano basándose en los conocimientos de *P. infestans*, ambos pertenecientes al grupo de los Oomycetes.

ABSTRACT

Animal and plant pathogens keep certain features in common regarding their mechanisms of infection and virulence factors. The study of plant pathogens is easy and viable; therefore, several models have been proposed for the analysis of infections in humans using plant pathosystems. In this work the study of the human pathogen *Pythium insidiosum* is proposed using molecular techniques described for the study of *Phytophthora infestans*, the causal agent of late blight in Solanaceae. To achieve this goal, a contribution to the study of pathogens in the Andean states of Venezuela is presented. We propose a new molecular marker for the population analysis of *P. infestans* through the restriction of the *B1* locus. The study of *P. infestans* isolates from tomato plants in Mérida state is also completed as well as the genetic characterization of *P. infestans* samples isolated from potato plants grown in Trujillo state, along with the so-called Mérida native potatoes, making use of mating type, mitochondrial haplotype and microsatellites markers. Additionally, the study of the mannitol dehydrogenase enzyme gene of *P. infestans* was also initiated, reaching the cloning and sequence analysis of the gene; finally, some molecular markers used to study *P. infestans* isolates were successfully assayed in *P. insidiosum*. It can be stated that it is possible to approach the study of human pathogens based on the knowledge of plant pathogens, in this case both belonging to the group of Oomycetes.

INTRODUCCIÓN

Los oomycetes son un grupo muy diverso de organismos “similares a hongos”, conformado por aproximadamente 700 especies, donde se encuentran incluidos un gran número de organismos saprófitos y patógenos de plantas, insectos, crustáceos, peces, vertebrados, y varios microorganismos (Tabla 1) (Kamoun, 2003; Guarro *et al.*, 1999).

Tabla 1. Principales géneros de los Oomycetes patogénicos (Kamoun, 2003).

Género	Hospedador(es)	Descripción
<i>Albugo</i>	Plantas	Patógenos obligados de plantas
<i>Aphanomyces</i>	Animales y plantas	Mayormente patógenos de animales acuáticos, pero incluye patógenos de plantas
<i>Bremia</i>	Plantas	Patógenos obligados de plantas
<i>Lagenidium</i>	Animales	Patógenos de animales acuáticos
<i>Peronospora</i>	Plantas	Patógenos obligados de plantas
<i>Phytophthora</i>	Plantas	Género más estudiado, con más de 60 especies causantes de enfermedades en dicotiledóneas
<i>Plasmopara</i>	Plantas	Patógenos obligados de plantas
<i>Pythium</i>	Plantas, animales y microorganismos	En su mayoría patógenos de plantas, y una especie que infecta mamíferos, incluyendo humanos
<i>Saprolegnia</i>	Animales	Patógeno de animales acuáticos, en su mayoría peces

Inicialmente, este grupo fue clasificado dentro del reino Fungi; sin embargo, análisis bioquímicos y de biología molecular demostraron que los oomycetes tienen pocas afinidades taxonómicas con los hongos filamentosos. Por el contrario, se encuentran más emparentados con las algas, quedando así clasificados dentro

del linaje eucariota de los Chromalveolata, el cual comprende seis grandes grupos de organismos unicelulares: Apicomplexa, Dinoflagelados, Ciliados, Cryptomonados, Haptofitos y Stramenopiles— muchos de los cuales tienen grandes efectos en la salud y la economía. Incluidos en el taxón Chromalveolata, además de importantes patógenos de plantas, encontramos al agente causal de la malaria, un alveolado apicomplexa, y el causante de la tripanosomiasis, un kinetoplastidio flagelado. Estos organismos se caracterizan por la presencia generalizada de plastidios derivado de endosimbiosis secundaria (Patterson, 2000; Keeling *et al.*, 2009).

Stramenopiles (Chromista o Heterokontophyta) es un grupo monofilético de organismos eucariotas que se caracterizan por presentar células móviles típicamente biflageladas y crestas mitocondriales tubulares (Keeling *et al.*, 2009). El grupo incluye importantes organismos como *Opalina*, *Blastocystis*, *Bolidomonas*, cromófitos o algas heterokontes (diatomeas, algas marrones y algas doradas) y organismos tradicionalmente estudiados por micólogos como los Oomycetes, Hyphochytriomycetes y Labyrinthulomycetes (Fig. 1) (Adl *et al.*, 2005).

Dentro de las características distintivas de los oomycetes encontramos las siguientes (Fry y Grünwald, 2010):

- Muy rara vez presentan un micelio septado, resultando en una condición multinucleada (micelio cenocítico).
- La pared celular está compuesta de β -1,3 y β -1,6 glucanos y polímeros de celulosa.

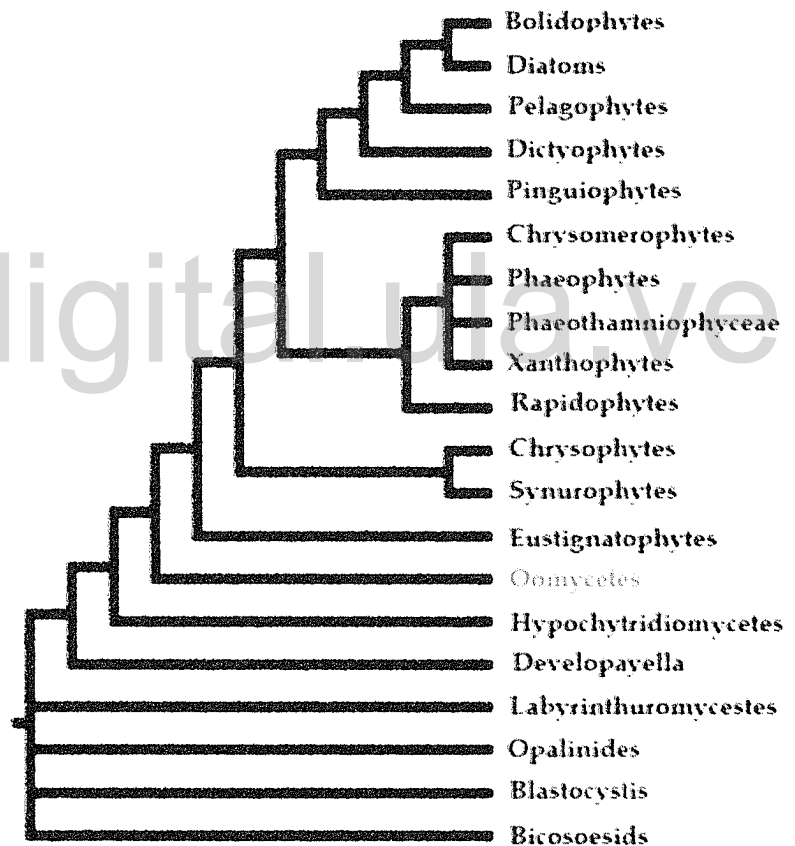
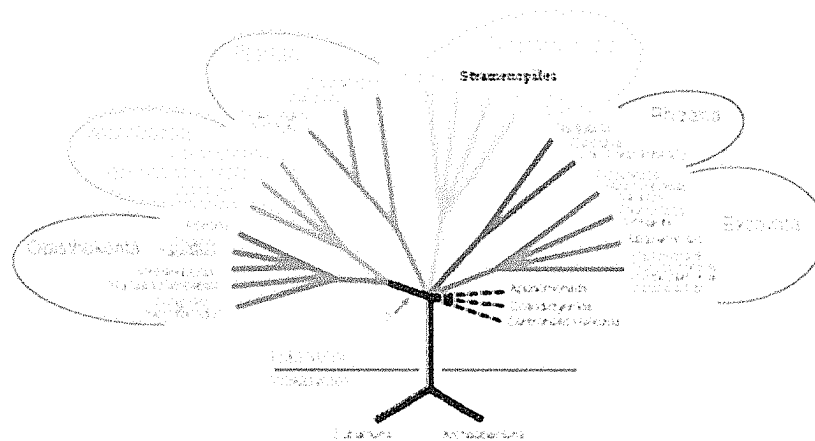


Figura 1. Miembros del grupo Stramenopiles (Bailey, 2010).

- La mayoría de las especies producen zoosporas acuáticas en estructuras denominadas esporangios. Éstas zoosporas se caracterizan por carecer de pared celular y ser biflageladas; el flagelo anterior es de tipo pincel (presenta mastigonemas), y el flagelo posterior es tipo látigo; ambos se unen típicamente a un surco ventral.

La reproducción sexual ocurre por la unión de los gametangios (oogonio y anteridio) y, debido a que la meiosis no ocurre hasta la formación de éstas estructuras, los núcleos de las células vegetativas son diploides. Todas las especies de *Pythium* son homotáticas ya que no requieren el contacto de distintos tipos de apareamiento para reproducirse sexualmente, lo contrario a lo observado en la mayoría de las especies de *Phytophthora* y otros oomycetes, que son heterotáticos.

Pythium insidiosum

Importantes patógenos se encuentran incluidos dentro del grupo de los Oomycetes; unos de ellos son los pertenecientes al género *Pythium*. Considerado un género cosmopolita y diverso biológicamente, es uno de los grupos de oomycetes fitopatógenos más devastadores, y por lo tanto, más conocidos. La mayoría de los miembros de sus especies habitan en el suelo, aunque algunos residen en santuarios de agua salada y otros ambientes acuáticos. El género comprende 140 especies saprófitas y parásitas, las cuales afectan plantas y animales, mientras que otras especies de *Pythium* pueden ser usadas como control biológico de fitopatógenos (Senda *et al.*, 2009).

Varias de las especies fitopatógenas de Oomycetes son bien conocidas por causar impacto en cultivos de importancia económica. Algunas de las enfermedades más conocidas son el “*damping-off*”, que afecta plántulas de todo tipo, así como la pudrición de semillas posterior a la germinación, y la pudrición de plantas maduras y frutos carnosos. Por su parte, *P. insidiosum* y *P. aphanidermatum* son conocidos por causar graves enfermedades en animales, incluyendo humanos (Agrios, 2005; Fry y Grünwald, 2010, Levesque *et al.*, 2010; Calvano *et al.*, 2011).

P. insidiosum es una especie única desde el punto de vista ecológico y fisiológico ya que, en contraste con otras especies del género, desarrolló la capacidad de causar patologías en animales. Ésta especie se conoce como el agente etiológico de la pitiosis, enfermedad que afecta principalmente a mamíferos. El mayor número de casos se ha reportado en perros, caballos y humanos. Sólo se conocen esporádicos reportes en ovejas, aves y animales tropicales mantenidos en cautiverio (Krajaejun *et al.*, 2006; Gaastra *et al.*, 2010).

Tailandia es considerado el sitio de origen de la pitiosis y generalmente se manifiesta en zonas tropicales, subtropicales y en regiones templadas, aunque recientemente se han reportado casos en California y Arizona, donde el clima es bastante distinto al usual para el patógeno. Esto parece indicar que el nicho de *P. insidiosum* está expandiéndose, probablemente como consecuencia de los cambios climáticos observados en los últimos tiempos (Berryessa *et al.*, 2008).

Inicialmente, la enfermedad fue denominada *Hyphomycosis destruens equi*,

aunque fueron varios los nombres con los que se conoció, incluyendo bursate, espundia (Latino América), ficomicosis equina (Australia y EEUU), dermatitidis granular (Japón), sanguijuelas (EEUU), cáncer de pantano (Australia) y llagas de verano (EEUU, Australia y América latina) (Gaastra *et al.*, 2010).

El primer reporte del agente causal de la enfermedad probablemente fue hecho en el año 1884 por Smith y en 1896 por Drouin (citados por Gaastra *et al.*, 2010), pero fue aislado por primera vez en 1901 por los científicos holandeses, Haan y Hoogkamer (citados por Gaastra *et al.*, 2010), a partir de caballos enfermos provenientes de Indonesia. En 1924, otro holandés de nombre J. Witkamp (citados por Gaastra *et al.*, 2010), aisló nuevamente al patógeno llamándolo *Hyphomyces destruens*, de acuerdo al nombre que se le daba a la enfermedad. Posteriormente, la enfermedad fue llamada ficomicosis al relacionar al agente causal con un Zygomycete (*Moertierella*), por observación de las zoosporas que se desarrollaban en el cultivo en el medio Agar-Sabouraud-Dextrosa. Posteriormente, se clasificó al organismo dentro de los oomycetes, género *Pythium*, y basados en este descubrimiento, en 1980 se propone el nombre de pitiosis o *pythiosis insidiosus* para la enfermedad (De Cock *et al.*, 1987, Krajaejun *et al.*, 2006; Gaastra *et al.*, 2010).

Hasta la década de los 80's se consideró a la pitiosis como una patología exclusivamente animal; actualmente es reconocida como una enfermedad emergente, de la cual se han reportado múltiples casos (Gimenes *et al.*, 2005; Ausina y Moreno, 2006; Krajaejun *et al.*, 2006). El primer reporte oficial de pitiosis humana ocurrió en Tailandia, específicamente en el año 1985, en el hospital de

Siriraj (Mahidol University). Dos hombres de 23 y 26 años provenientes de una zona rural desarrollaron dolorosas úlceras granulomatosas, con infiltración difusa, edema de las paredes de los vasos y evidencia del fenómeno de Splendore-Hoepple. La biopsia de la lesión fue cultivada en medio Sabouraud-Dextrosa-Agar, donde luego de tres días se observaron colonias blancas, compuestas de hifas cenocíticas, de 4-10 μm de diámetro, en las cuales se observó un citoplasma granular (Imwidthaya, 1994).

Posteriormente, entre los años 1987 y 1988 se reportó la enfermedad como infección sistémica. En este caso se trató de pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 19-46 años, en el hospital de Ramathibodi (Mahidol University). Al igual que en el reporte anterior, los pacientes provenían de granjas y zonas rurales, y acudieron al hospital por presentar dolor e hinchazón en las extremidades producto de una inflamación y oclusión arterial crónica causada por la invasión del microorganismo. Estos síntomas resultaron en gangrena, formación de aneurismas o la amputación de las extremidades afectadas; dos pacientes murieron a causa de fugas aórticas (Imwidthaya, 1994).

Después de los primeros dos reportes se presentaron esporádicos casos de pitiosis en los cuales los pacientes presentaron necrosis arterial y trombosis, predominantemente en las arterias de las extremidades inferiores. Pruebas histopatológicas revelaron que la infección fue ascendiendo por las arterias, y las autopsias de los pacientes mostraron invasión del microorganismo en bazo, riñones y pulmones (Imwidthaya, 1994).

También en el año 1988 ocurrió el primer reporte de la enfermedad como keratitis: los afectados provenían de zonas rurales, y además, todos presentaron un historial de abrasión o lesión. Los síntomas clínicos no se diferenciaron de una keratitis micótica tradicional. Los pacientes terminaron la evolución de su cuadro clínico con queratoplastia, evisceración o enucleación (Imwidthaya, 1994).

Como se evidenció en éstos primeros casos reportados en Tailandia, la infección por *P. insidiosum* puede presentar distintas patologías. En general, la pitiosis se define en animales como una enfermedad subcutánea, vascular, y en menor frecuencia, intestinal. Se caracteriza por el desarrollo en el paciente de lesiones granulomatosas que crecen rápidamente, tornándose graves en algunos casos (Castillo-Jiménez *et al.*, 2013). En el hombre, la pitiosis se asocia con alteraciones hematológicas, sobre todo en pacientes talasémicos (Krajaejun *et al.*, 2006). Para la pitiosis ocular no se ha detectado una enfermedad base, pero sí posibles factores de riesgo como traumatismo ocular previo, uso de lentes de contacto y baños en aguas templadas; actividades relacionadas con la agricultura y el agua estancada son consideradas un factor de predisposición para la pitiosis en humanos (Castillo-Jiménez *et al.*, 2013).

Vanittanakom *et al.* (2004) reportaron que de los casos conseguidos en humanos, el 50% fue del tipo vascular, 41% del tipo ocular y 3% del tipo subcutáneo. Posteriormente, Gaastra *et al.*, (2010) reportan que en cada 100 casos de pitiosis en humanos, se pueden describir 4 formas distintas:

1. Pitiosis subcutánea, encontrada en el 5% de los casos, que se caracteriza

por el desarrollo de úlceras o lesiones granulomatosas en el rostro y/o labios del paciente.

2. Pitiosis vascular, encontrada en el 59% de los casos, afecta arterias y resulta en oclusión arterial y aneurismas.

3. Pitiosis ocular, se caracteriza por la formación de úlceras en la córnea y se presenta en el 33% de los casos.

4. Pitiosis en lugares inusuales. La diseminación de la infección por *Pythium* en órganos internos se ha observado en el 3% de los casos reportados.

En Venezuela no se han encontrado casos de infección por *P. insidiosum* en humanos, pero sí se ha reportado como un problema veterinario, realizándose varios estudios de pitiosis gastrointestinal canina, donde se observó con marcada frecuencia el diagnóstico en pacientes con diarrea hemorrágica crónica de más de tres semanas de evolución, eosinofilia marcada y la presencia de una masa periforme, redondeada o tubular infiltrativa, ubicada generalmente en el intestino delgado y en la válvula ileocecal (Salas *et al.*, 2009).

Diagnóstico de la Pitiosis

El diagnóstico de la infección por *Pythium* es muy importante para el correcto tratamiento de la enfermedad, pero generalmente se establece tardíamente, por lo que la enfermedad suele evolucionar hacia la muerte del organismo afectado (Fernandes *et al.*, 2012). Inicialmente la pitiosis era confundida con varias enfermedades como la habronemiasis causada por el nemátodo

Habronema muscae y *H. majus*, infecciones de la piel causadas por los hongos *Conodiobolus* y *Basidiobolus* spp., granulación bacteriana del tejido o invasión de células cancerígenas (Gaastra *et al.*, 2010). En la actualidad se han desarrollado distintos métodos de diagnóstico entre los que resaltan la colecta, examen al microscopio, cultivo e identificación del agente causal, así como examen histopatológico y pruebas serológicas de muestras tomadas de pacientes con los síntomas de la enfermedad y signos del agente etiológico.

Recientemente, se publicó un trabajo donde se comparan los diferentes métodos de diagnóstico serológico desarrollados para la pitiosis usando 37 pacientes humanos infectados y 248 sujetos control. Tras poner a prueba cada uno de los procedimientos se encontró que los ensayos por inmunocromatografía y ELISA brindaron un diagnóstico óptimo, con 100% de sensibilidad, especificidad y valor de predicción de positivos y negativos. Además, la técnica inmunocromatográfica es rápida y amigable, mientras que la de ELISA es realmente cuantificable. Por su parte, la inmunodifusión es relativamente insensible y la hemaglutinación es rápida, pero la eficiencia del diagnóstico resultó ser pobre. La comprensión de las ventajas y desventajas ofrecidas por cada ensayo facilita la selección de un método de diagnóstico apropiado según las circunstancias del caso, promoviendo así diagnósticos más tempranos y mejores resultados en el tratamiento (Chareonsirisuthigul *et al.*, 2013).

En cuanto a la detección e identificación del patógeno, se han desarrollado pruebas moleculares basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction) y secuenciación

de ácidos nucleicos. Para ello se han utilizado los genes *ARNr 18S*, *ITS* (Internal Transcribed Spacer) y *COXI*, con que permiten la amplificación, secuenciación y comparación por similitud de las regiones en estudio con las secuencias de *P. insidiosum* reportadas en el GenBank (Salipante *et al.*, 2012). Los iniciadores de la reacción de PCR para la secuenciación del gen *ARNr 18S* fueron diseñados por Vanittanakom *et al.* (2004), los necesarios para amplificar la región *ITS* fueron diseñados por Grooters y Gee (2002), y los iniciadores para obtener el amplicón de *COXI* fueron reportados en el 2011 por Robideau *et al.*, encontrándose en todos los casos que el método resultó ser rápido y eficaz en la identificación de *P. insidiosum*.

Tratamiento de la Pitiosis

La respuesta de la infección causada por *P. insidiosum* a las terapias en uso generalmente es muy pobre; las más usadas son la extirpación quirúrgica, agentes antimicrobianos y las terapias inmunológicas. Independientemente del tipo de terapia que se use para controlar la enfermedad, es necesario ponerla en práctica de forma temprana, siendo crucial el diagnóstico a tiempo (Gaastra *et al.*, 2010).

Las cirugías, utilizadas en animales y humanos, incluyen amputaciones y extirpación quirúrgica de lesiones en la piel de perros y caballos con la enfermedad. Este es el método más conocido y empleado, ya que se ha utilizado en un 45% de los casos (Gaastra *et al.*, 2010).

En el caso de las terapias antimicrobianas, cuando se creía que *P. insidiosum* era un hongo, se usaron varios antimicóticos para tratar la infección; sin embargo,

los Stramenopiles presentan diferencias importantes frente a los hongos, haciéndolos no susceptibles a este tipo de agentes. La diferencia principal es la carencia de ergosterol, ya que los agentes que interfieren en la biosíntesis de ergosterol son los más usados para terapias antimicóticas. Estos agentes son similares a los azoles (itraconazol, ketoconazol, miconazol y fluconazol), terbinafina y amfotericina B, cuyo mecanismo de acción se basa en el cambio de la permeabilidad de la membrana celular que lleva a la lisis de las células del patógeno (Shenep *et al.*, 1998; Gaastra *et al.*, 2010).

En el caso de inmunoterapias usadas para el tratamiento de la pitiosis en caballo, se han obtenido buenos resultados. Este tipo de terapias se ha utilizado por más de 20 años, y hasta hoy más de 600 animales han sido tratados de esta manera. La primera vacuna se desarrolló en 1981 y derivaba de micelio muerto por ultrasonificación; fue efectiva para pacientes equinos, observando mejoras clínicas en 33% de los casos. Una segunda vacuna fue probada en caballos de Costa Rica; en este caso la vacuna contenía antígenos secretados por *P. insidiosum* obtenidos por precipitación del cultivo, y la eficiencia no fue muy diferente a la encontrada anteriormente. Para hallar mejores resultados en cuanto a la mejoría de animales infectados, se aplicó una terapia con la combinación de agentes antimicóticos y la vacuna, encontrando entonces que de 18 caballos y 6 perros infectados, se curaron 72% de los caballos y 2 de los perros (Mendoza y Newton, 2005; Gaastra *et al.*, 2010).

En humanos, la inmunoterapia fue usada por primera vez en 1998 en un joven tailandés que presentaba pitiosis vascular y para quien la terapia antimicótica no había tenido efecto; el paciente tomó varias dosis de la vacuna y en un año se pudo observar la curación. Pruebas posteriores realizadas en 6 pacientes infectados mostraron que luego de la toma de dos dosis de la vacuna, cuatro de los pacientes tuvieron una clara mejoría mientras que en dos no se observó respuesta. Se supone que la terapia funciona mejor si se aplica tan pronto como se diagnostique la enfermedad, ya que está comprobado que la mortalidad aumenta con más de dos meses después que se ha presentado la lesión. De los pacientes tailandeses que han recibido tratamiento inmunológico, el 55% se ha curado (Wanachiwanawin, 2004).

Por otro lado, Pires *et al.* (2013), publicaron un tratamiento alternativo para el control de pitiosis. Se trata de una terapia fotodinámica que utiliza la interacción de un fotosensibilizador, luz y moléculas de oxígeno para causar la muerte celular. Se probaron dos fotosensibilizadores, uno derivado de hematoporfirina y fotoditazina, y como control anfotericina B y solución salina; se inocularon conejos con zoosporas del patógeno, y en un área de 1 cm² se aplicó el tratamiento con los fotosensibilizadores. La irradiación se llevó a cabo con el uso de láser y los conejos se evaluaron diariamente. La tasa de inhibición, luego de la terapia fotodinámica, varió del 60 al 100% *in vitro* e *in vivo*; luego de la terapia, el análisis histológico de las lesiones mostró la ausencia de infección en hasta 1 cm de profundidad,

resultando eficaz en la inactivación de *P. insidiosum*, lo cual representa un nuevo enfoque para el tratamiento.

Phytophthora infestans

Otro género de gran importancia perteneciente al grupo de los oomycetes es *Phytophthora*. Prácticamente todas las plantas dicotiledóneas son afectadas por una o más especies de éste género (Kamoun, 2003). El nombre *Phytophthora* deriva del griego *Phyto*= planta y *Phthora*= destructor; por lo tanto, su traducción es “destructor de plantas”. Y con buenas razones, ya que las especies del género, como se mencionó antes, causan una variedad de devastadoras enfermedades en muchas diferentes plantas hospedadoras, que van desde hierbas anuales u ornamentales hasta árboles frutales y forestales (Agrios, 2005).

Algunas de las sesenta especies reconocidas del género (Kroon *et al.*, 2004), que han sido mejor estudiadas son *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. fragariae*, *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. megasperma* y *P. parasitica*. Sin embargo, la especie mejor conocida es *P. infestans*, causante de la candelilla tardía en solanáceas (Becktell *et al.*, 2006).

En 1861 el científico alemán Heinrich Anton de Bary, luego de varios años de investigación y de la contribución de un importante número de investigadores reconocidos, confirmó que *P. infestans* era el organismo causante de la pudrición de los cultivos de papa ocurrida en el norte de Europa, específicamente en Irlanda, durante los años 1840s (Ristaino, 2006). Esta epidemia provocó la muerte de cientos

de miles de personas y la migración a Estados Unidos de más de un millón y medio de ellas (Agrios, 2005).

Posterior a este lamentable acontecimiento, la presencia de la enfermedad fue reportándose en varios países alrededor del mundo, e incluso se cree que la enfermedad estuvo presente en América antes de la devastadora hambruna de Irlanda (Abad y Abad, 1997).

El lugar de origen del patógeno no ha sido resuelto aún; se han propuesto varias hipótesis, de las cuales las más debatidas en la actualidad proponen que *P. infestans* proviene o bien de los Andes Suramericanos, o bien del centro de México. Para ambos lugares se han encontrado buenas evidencias que indican que cualquiera de éstos podría ser el centro de origen del patógeno (Jaramillo, 2003).

En México se reportó por primera vez la reproducción sexual del patógeno y se encontraron ambos tipos de talos en igual proporción; asimismo, en este lugar se ha descubierto la mayor diversidad en caracteres de virulencia y alelos enzimáticos (Fry *et al.*, 1993; Abad y Abad, 1997). Por otro lado, recientemente Gómez-Alpizar *et al.* (2007), al analizar molecularmente muestras de herbario de papas infectadas por la enfermedad cuando ésta se presentó por primera vez en Europa, encontraron resultados que apoyan la hipótesis inicial de varios científicos como de Bary y Berkeley, quienes postularon que el patógeno provino originalmente de Suramérica (Abad y Abad, 1997).

Recientemente, Yoshida *et al.* (2013) compararon el genoma de once aislados de herbario y de quince modernos, concluyendo que la epidemia del siglo XIX fue

causada por un genotipo único, denominado HERB-1, el cual es distinto a todos los aislados modernos examinados, pero muy cercano al tipo US-1 encontrado en México en el siglo XX. Estos autores sugieren además que los linajes HERB-1 y US-1 surgieron de una metapoblación que se estableció a principios de la década de 1800 fuera de su centro de diversidad.

Gómez-Alpizar *et al.* (2007) también encontraron un aislado proveniente de miembros de la sección Anarrhichomenum de *Solanum* en las regiones andinas de Suramérica, que inicialmente fue descrito como *P. infestans*, pero que luego de análisis moleculares se propuso como una nueva especie denominada *P. andina*, la cual aparentemente surgió como híbrido entre *P. infestans* y *P. mirabilis* (Gómez-Alpizar *et al.*, 2008). Posteriormente, Goss *et al.*, en el 2011 pusieron a prueba esta hipótesis clonando 4 loci nucleares de *P. andina*, *P. infestans* y otras especies afines con el fin de inferir las relaciones filogenéticas entre ellas, llegando a la conclusión de que *P. andina* surgió en los Andes suramericanos como híbrido entre *P. infestans* y otra especie aún desconocida del género.

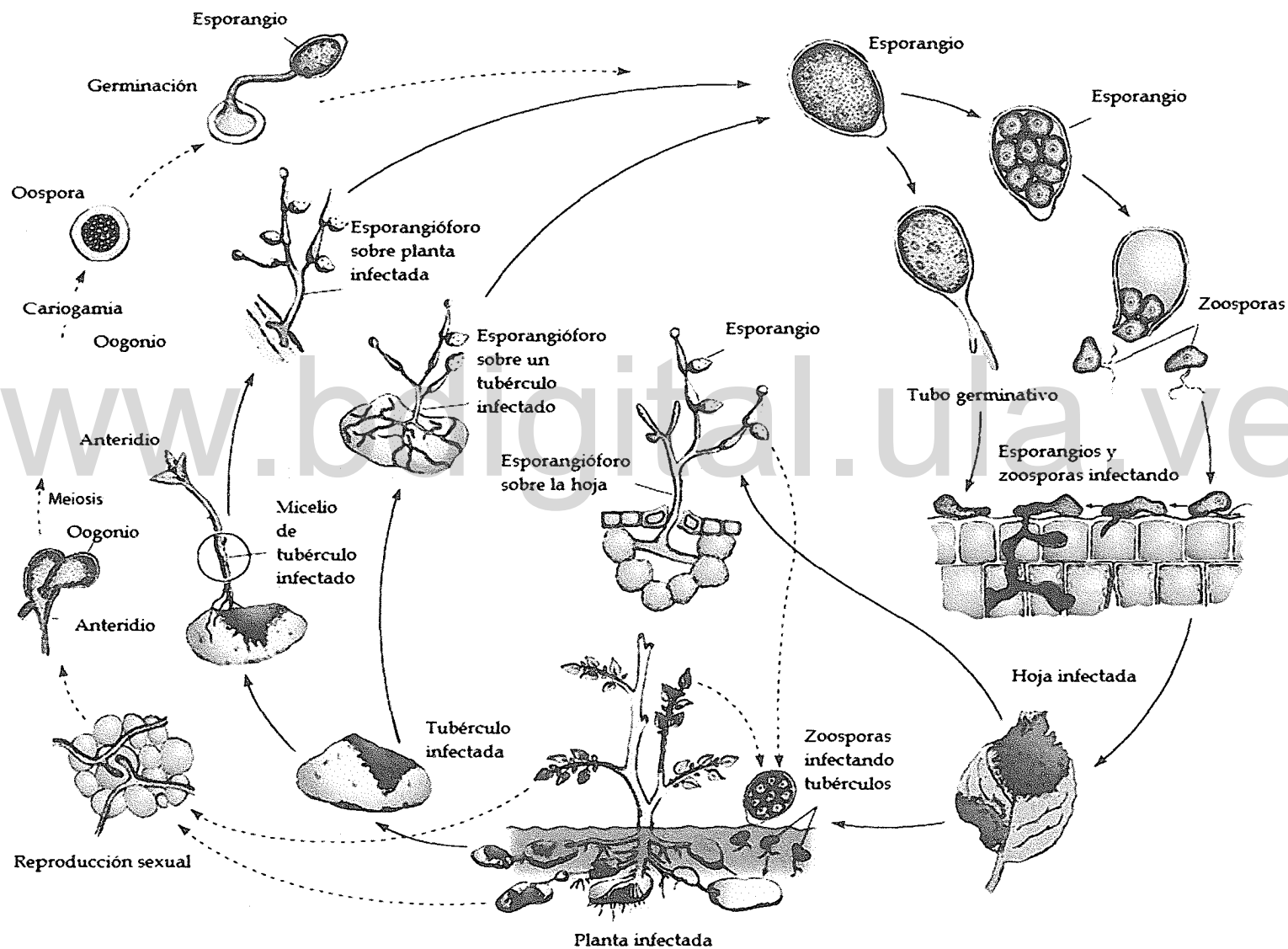
Actualmente, la candelilla tardía causada por *P. infestans* sigue siendo un problema grave en cultivos de todo el mundo, y no sólo por los daños directos que causa a las plantas, sino también por los métodos utilizados para su control. El manejo integrado de los cultivos ha sido efectivo en muchos casos. Sin embargo, la estrategia más eficiente, y por lo tanto más utilizada, involucra el uso de fungicidas, lo cual, como es bien conocido, causa grandes daños a los cultivos, productores, consumidores y el ambiente, y en muchos casos el uso indiscriminado

y el desacato a las principales normas de seguridad recomendadas, hace que la problemática resultante de la estrategia de control sea aun más grave que la propia enfermedad (Jaramillo, 2003).

Ciclo de vida de *P. infestans*

Las estructuras somáticas de *P. infestans* son denominadas micelio, las cuales están compuestos por hifas cenocíticas, en las cuales el citoplasma fluye libremente. El micelio es de tamaño variable, y dependiendo de la naturaleza del medio, crece en la superficie aérea, sumergido en el medio o dentro de las células hospedadoras (Jaramillo, 2003). Aunque hay especies del género *Phytophthora* que tienen patrones de micelio característicos, generalmente esto no es suficiente para diferenciar especies, ni tampoco lo son el crecimiento ni el hinchamiento de las hifas (Erwin y Ribeiro, 1996).

P. infestans puede reproducirse de forma sexual o asexual (Fig. 2). La mayoría de las poblaciones causantes de grandes epidemias que se han caracterizado, han surgido por propagación asexual. El esporangio es la unidad fundamental de este tipo de reproducción; una sola lesión puede producir hasta 300 mil esporangios en una noche (Agrios, 2005, Kamoun, 2001 y Jaramillo, 2003). En las terminaciones de hifas especializadas (esporangióforos) se desarrollan los esporangios multinucleados, los cuales pueden germinar de forma directa o indirecta, dependiendo de las condiciones ambientales (Judelson *et al.*, 2008). Los esporangios germinan de forma indirecta; es decir, liberan al medio zoosporas biflageladas en un rango de temperatura entre 12 y 15°C, mientras que si la



temperatura es mayor a 15°C el esporangio germina directamente desarrollando un tubo germinativo, el cual al entrar en contacto con la planta hospedadora penetra la epidermis de los folíolos y tallo; en los tubérculos, penetra a través de las lenticelas o heridas (Agrios, 2005).

Dentro del género *Phytophthora*, los esporangios se diferencian entre sí porque en cada especie cada uno cuenta con características propias en cuanto a la forma, tamaño y longitud del pedúnculo. *P. infestans* y *P. phaseoli* son las dos únicas especies del género que producen esporangios que se desprenden y son arrastrados por el aire y el agua. Por su parte, los esporangios de *P. infestans* son fácilmente reconocibles por su forma limoniforme, y un pedúnculo que se encuentra en el rango de medio a corto; en cuanto al tamaño, éste depende del medio de cultivo, pero van de aproximadamente 29x19 a 59x31 µm. Esta especie también presenta hinchamientos característicos por encima de la zona donde se desprende el esporangio, y el engrosamiento apical del esporangio, de cuyo extremo emergen las zoosporas; en este caso, es semipapilado (es decir, con una cavidad superficial, cuyo poro es generalmente estrecho) (Agrios, 2005 y Jaramillo, 2003).

En cuanto a las zoosporas, éstas son células uninucleadas características de los organismos heterokontes, con dos flagelos: uno en forma de látigo, y otro que presenta mastigonemas, en algunos casos conocido como forma de pluma. La zoospora está conformada por el kinetosoma, la zona de transición que une el flagelo con el kinetosoma y el sistema de microtúbulos, típico de eucariotas, que

permite el anclaje del flagelo a la zoospora. El proceso de formación de las zoosporas involucra un clivaje celular en el cual, vesículas y otros componentes, se reorganizan dentro del esporangio, formando de 6 a 12 células mononucleadas. Las zoosporas, para despojarse de sus flagelos, forman una pared rica en glicoproteínas que facilitan su unión a la superficie de la planta, todo en aproximadamente un minuto. Finalmente, luego de 2 horas, cada zoospora desarrolla un tubo germinativo que secuencialmente formará un apresorio (Judelson *et al.*, 2008).

Judelson *et al.* en el 2008 publican un trabajo donde se reseña la expresión genética durante el desarrollo asexual de *P. infestans*. Este trabajo se logró con el diseño de microarreglos basado en 15.650 unigenes, de los cuales se encontró que alrededor del 60% exhiben diferencias significativas en la expresión entre las etapas de transición del desarrollo de la enfermedad, y aproximadamente 15% existe sólo en un estado específico, la mayoría durante la zoosporogénesis. Se observó expresión diferencial en genes que codifican para potenciales reguladores celulares, especialmente proteínas-quinasas, enzimas metabólicas involucradas en la glicólisis, gluconeogénesis o biosíntesis de aminoácidos o lípidos, reguladores de síntesis de ADN, proteínas estructurales (incluidas proteínas flagelares), factores de patogenicidad que incluyen a enzimas degradativas de la pared celular del hospedador, y curiosamente, algunos transcritos estado-específicos que aparentemente no codifican para proteínas funcionales (o de las cuales no se conoce su función).

En general, esto refleja un importante grado de remodelado del transcriptoma comparado con otros patógenos como *Uromyces maydis* en el cual, durante la germinación de la teliospora, sólo el 5,9% de los genes muestran cambios en su expresión. La principal razón de este alto número de genes reguladores en *P. infestans* podría estar relacionada con las dramáticas diferencias estructurales y fisiológicas entre las zoosporas y los otros estadios de su ciclo de vida. Otra explicación podría ser que cuando los esporangios están completamente hidratados y metabólicamente activos, se emplean métodos celulares para mantener su viabilidad, detener la temprana germinación y evitar la desecación de la espora, tal como se ha descrito para los hongos verdaderos (Judelson *et al.*, 2008).

Por otro lado, para que ocurra la reproducción sexual es necesario que la estructura masculina (anteridio) se asocie con la estructura femenina (oogonio), para así formar la oospora. *P. infestans* es una especie heterotálica, y por lo tanto, para que ocurra esta vía del ciclo vital es necesaria la presencia de los dos tipos de talo conocidos, denominados A1 y A2. Cada tipo de talo produce tanto oogonios como anteridios en respuesta a la hormona producida por el talo contrario (Agrios, 2005; Kamoun, 2001).

El oogonio y anteridio crecen en el ápice de las hifas que entran en contacto. En el caso de *P. infestans*, el anteridio es anfiginio, es decir, el oogonio crece a través del anteridio permitiendo la fertilización, e inmediatamente antes del desarrollo de los gametangios ocurre la meiosis, representando el único estadio haploide (n) del ciclo de vida de este organismo. La cariogamia se verifica entre estos dos núcleos

haploides formando una oospora diplode ($2n$) uninucleada de paredes gruesas, que puede servir además como estructura de supervivencia para el invierno en las zonas templadas (Fig. 2) (Henfling, 1987, Agrios, 2005 y Jaramillo, 2003).

La regulación hormonal de la reproducción sexual en especies de *Phytophthora* fue propuesta por primera vez en el año 1929. El factor de secreción del tipo de talo A1, la hormona $\alpha 1$, induce la producción de oosporas en el tipo de talo A2, mientras la hormona $\alpha 2$ excretada por el tipo de talo A2, induce la producción de oosporas en A1. Qi *et al.* (2005) describieron la estructura química de la hormona $\alpha 1$, y realizaron estudios para determinar la dosis necesaria para la inducción de la formación de oosporas en varias especies del género *Phytophthora*.

Estos autores encontraron que la actividad de la hormona es capaz de inducir la formación de oosporas en cuatro especies distintas del género: *P. infestans*, *P. nicotianae*, *P. cambivora* y *P. capsici*. Por otro lado, al tratar micelios con este compuesto se logró inhibir la formación de esporangios. Todos estos hallazgos indican que esta sustancia puede ser la hormona reguladora de la formación de estructuras sexuales en distintos organismos heterotálicos (Qi *et al.*, 2005).

La migración del tipo de talo A2 de *P. infestans* del centro de México a Europa, que comenzó alrededor de los 70s, dio lugar a la reproducción sexual en áreas donde ésta aún no era común. Observaciones tempranas permitieron describir la producción de oosporas en el centro de México, donde los dos tipos de talo existen en igual proporción; posteriormente se observó reproducción sexual del patógeno en Europa, específicamente en Holanda, y luego fue observada en

Asia, concretamente Japón, y posiblemente en África. En Israel, se encontró un pequeño número de oosporas en tubérculos de papa, y en Europa la formación de las estructuras sexuales en hojas de papa siguió aumentando con el reporte de Alemania, en un rango de temperatura que va de 5 a 25°C con un óptimo de 10°C (Jaramillo, 2003 y Cohen *et al.*, 1996). Este evento es bastante preocupante ya que trae como consecuencia el aumento de la variabilidad genética, además de que se ha demostrado que las oosporas de *P. infestans* pueden sobrevivir en el suelo durante el invierno, son resistentes a la desecación, y pueden causar infección en sus plantas hospedadoras sin problemas (Cohen *et al.*, 1996).

La autofertilización en *P. infestans* también es muy común y puede ser iniciada por muchos mecanismos; por ejemplo, con el cambio de medio de cultivo (Jaramillo, 2003). Por otro lado, otros estudios han mostrado que 96% de los aislamientos de tipo de talo A2 y 6% del A1 fueron autofértiles en agar-V8 (Smart y Fry, no publicado citado por Jaramillo, 2003).

El tipo de talo en *P. infestans* puede ser fácilmente determinado por medio de pruebas biológicas y moleculares. La prueba biológica consiste en la observación al microscopio de la formación de las estructuras sexuales luego del enfrentamiento del talo en estudio con uno referencial (Deahl *et al.*, 1990). También puede utilizarse la técnica de PCR usando primers específicos para confirmar el tipo de talo de un aislado problema (Judelson *et al.*, 1995; Judelson *et al.*, 1996).

Judelson *et al.* (1995), realizaron el mapeo genético de los loci correspondientes al tipo de talo por medio de marcadores moleculares ligados a

los caracteres A1 y A2, encontrando que el tipo de talo está ligado a una región nuclear de segregación no mendeliana. Así, se describió el locus *B1*, una región presente en ambos tipos de talo y el locus *S1*, representado por una simple región conservada en el estado hemicigótico del tipo A1, el cual se encuentra ausente en el talo A2 (Judelson *et al.*, 1996).

Para entender la regulación del proceso de reproducción sexual se identificaron y caracterizaron ocho genes que son sobre-regulados durante el apareamiento de aislados con tipo de talo distinto. Tres de éstos codifican potencialmente para proteínas que interaccionan con ARN, lo que sugiere que estabilizan o degradan ARN que participa en la transición de hifas a esporas sexuales (Fabritius *et al.*, 2002). Uno de estos genes conocido como *M90*, miembro de la familia Puf, codifica para un regulador que se une e inhibe la traducción de ARNm específicos.

Cvitanich y Judelson (2003), usando la fusión del promotor del gen *M90* al gen reportero β -glucuronidasa (GUS), presentaron un estudio detallado de la estructura y actividad del gen, incluyendo su distribución espacial y patrones temporales de expresión durante el desarrollo. Estos autores encontraron que miembros de la familia Puf, los cuales incluyen reguladores que son distribuidos en eucariotas unicelulares y multicelulares, participan en la esporulación sexual y asexual de *P. infestans*.

En hongos y plantas, las esporas y semillas contienen ARNm preformado que interviene en la estabilidad durante la desecación de dichas estructuras por

largo tiempo. En el caso de los oomycetes las esporas generalmente permanecen hidratadas; por lo tanto, se hace necesario encontrar una posible función adicional para proteínas de unión a ARN en oomycetes.

Una función atribuida en ese estudio a los genes de las proteínas Puf es la regulación de la traducción de la ciclina B, que normalmente permite el inicio de la mitosis. Esto también podría explicar porqué *M90* se expresa durante ambos tipos de esporulación en *P. infestans* (Cvitanich y Judelson, 2003).

Cuando comenzaron los estudios genéticos de este organismo, en general los oomycetes resultaban un tanto incomprensibles. Alrededor de los años 1970s, a pesar de todos los estudios llevados a cabo con el causante de la hambruna de Irlanda, no se había logrado determinar ciertos detalles de su ciclo vital; por ejemplo, que en la fase somática *P. infestans* es diplofásico, a diferencia de la mayoría de los hongos, los cuales son haplofásicos (Catal *et al.*, 2010). Los primeros estudios en aislados provenientes del centro de México determinaron que el organismo es diplofásico y generalmente diploide ($2n$), con un número básico de cromosoma de $x=9$ y un número de cromosoma haplofásico de $n=9$, $9+1$ y $9-1$, y por lo tanto, el número de cromosomas diplofásicos varían entre 16 y 20. El número de cromosomas haplofásicos fue determinado con dificultad ya que la meiosis ocurre en dos células adheridas, el oogonio y el anteridio, en un periodo de 15 a 40 días; por lo tanto, la sincronización de los cultivos en el laboratorio tiene ciertas dificultades (Sansome y Brasier, 1973).

Posteriormente, se reportó que los aislados provenientes de México (población sexual) eran diploides, mientras que los aislados no mexicanos (población asexual) eran poliploides, razón por la cual fitopatólogos de América y Europa concluyeron que *P. infestans* es generalmente diploide o poliploide (Tooley y Therrien, 1987).

Estudios citológicos también reportan un desbalance en el número de cromosomas de algunos aislados provenientes de regiones templadas. Hay reportes sobre *P. infestans* y *Bremia lactucae* que proponen que muchos de estos aislados contienen más de un núcleo distinto, formando micelios heterocariones $2n$, y con números de cromosomas de $2x$, $2x \pm 1$, $3x$ o $4x$ (Catal *et al.*, 2010).

Mecanismos de infección de *P. infestans*

Las especies pertenecientes al género *Phytophthora* presentan similitudes en su morfología, modo de adquisición de nutrientes, y principalmente, en sus estrategias de infección. En cualquier caso, es necesario que el patógeno establezca un contacto inicial con su potencial hospedador, se adhiera y penetre en él. La mayoría de las especies de *Phytophthora* son necrotróficos. Sin embargo, muchas otras son verdaderos biotrófos; en este caso la infección comienza con la aparición del tubo germinativo emergente de la espora, el cual se adhiere al tejido del hospedador, ocurre el reconocimiento del tejido y se desarrolla el apresorio, de

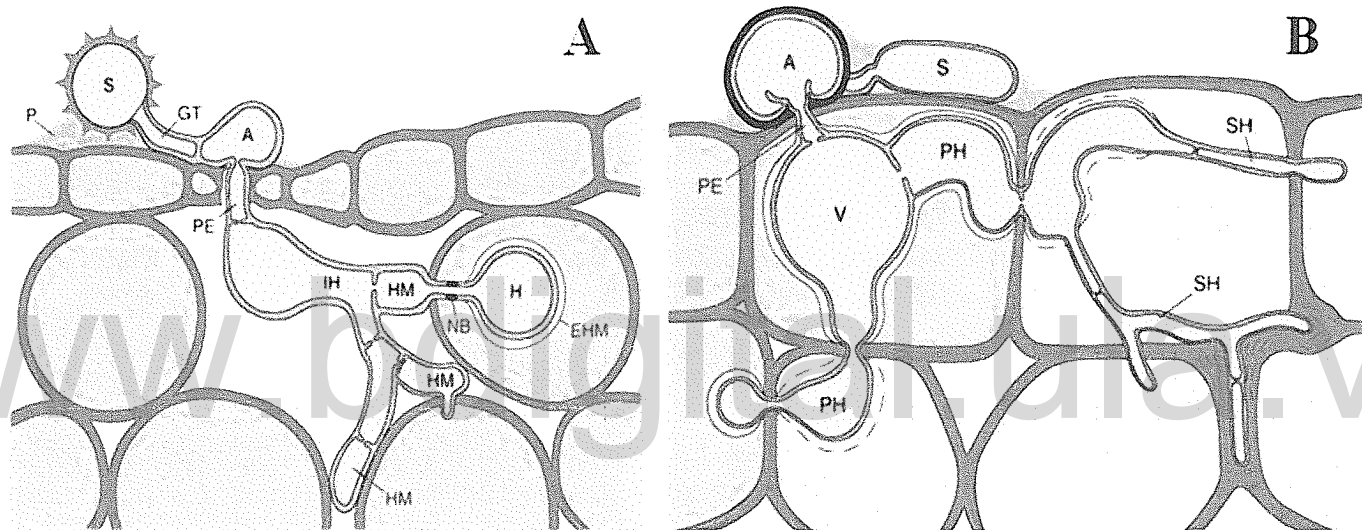


Figura 3. Infección por un parásito biotrófico, A. espora (S), apresorio (A), sustancias adhesivas (P), tubo germinativo (GT), hifa de penetración (PE), hifa de infección (IH), haustorio (H), célula madre del haustorio (HM), matriz extra haustorial (EHM). Infección por un parásito hemibiotrófico, B. apresorio (A), espora (S), hifa de penetración (PE), vesícula (V), hifa primaria (PH), hifa secundaria (SH) (Mendgen y Hahn, 2002).

donde a su vez emerge la hifa de penetración, y luego, crece la hifa de infección de donde se desarrolla la célula madre del haustorio, y a partir de ésta, el haustorio que invade la célula hospedadora (Fig. 3A) (Mendgen y Hahn, 2002). También, un número importante de organismos pertenecientes al género *Phytophthora* presentan un estilo de vida hemibiotrófico, como es el caso de *P. infestans*, donde se establece una relación biotrófica con la planta hospedadora, para luego pasar a una forma de vida necrotrófica (Agrios, 2005). Inicialmente, la espora se adhiere a la superficie de la planta hospedadora formando un tubo germinativo, el cual se melaniza y forma el apresorio. La hifa de penetración se desarrolla en la base del apresorio, ejerciendo presión entre la cutícula y la pared celular. Cuando la hifa de penetración se encuentra en la epidermis de la planta forma una vesícula, de donde a su vez se desarrolla la hifa primaria, la cual crece a través de una invaginación de la membrana plasmática. El protoplasto del hospedador permanece vivo durante el estado biotrófico y la matriz interfacial lo separa del protoplasto del patógeno. Uno o dos días después de la penetración la membrana plasmática comienza a desintegrarse ocasionando la muerte de la célula hospedadora, dando lugar a la etapa necrotrófica (Fig. 3B) (Agrios, 2003; Hardham y Shan, 2009; Mendgen y Hahn, 2002).

La infección en un potencial hospedador puede iniciarse con la interacción de la planta con diversas estructuras del patógeno, como hifas, esporangios, zoosporas u oosporas (Agrios, 2005). En el caso de los esporangios, como se mencionó anteriormente, pueden germinar directa o indirectamente. Si ocurre la

germinación indirecta se obtienen las zoosporas, las cuales pueden nadar a una velocidad de 200µm/s, cubriendo una distancia de varios centímetros, aunque también se ha demostrado que son capaces de nadar mostrando fenómenos de autoagregación (Hardham y Shan, 2009).

Las zoosporas son quimiotácticas y electrotácticas, siendo atraídas así hacia el posible sitio de infección en la superficie de la planta (Judelson *et al.*, 2008). En general, la respuesta táctica parece no ser específica y comienza con el estímulo de un gradiente de azúcares y aminoácidos que se difunden desde la superficie de las plantas (Hardham y Shan, 2009). También existen evidencias que indican que la atracción de oomycetes hacia distintas regiones de la superficie de la raíz involucra la electrotaxia, en la cual las células son capaces de detectar y nadar hacia aniones o cationes en la raíz (van West *et al.*, 2008).

El proceso de infección causada por *Phytophthora* comienza con la llegada de la espora al sitio blanco, seguida por la adhesión, penetración y colonización (Kamoun, 2003). Se ha reportado que la espora al entrar en contacto con el tejido del hospedador se orienta de una manera tal que puede distinguirse una zona ventral y otra dorsal, de donde se puede diferenciar la secreción vesicular de compuestos específicos (matriz extracelular) que contiene proteínas o glicoproteínas que facilitan la adhesión, y en algunos casos, también puede contener enzimas degradativas. La vesícula dorsal de *P. cinnamomi* libera la glicoproteína N-acetilgalactosamina, y para la sustancia secretada por la vesícula ventral se han reportado 47 copias del motivo trombospondina tipo I (PcVsv1),

una región conservada de 50 aminoácidos encontrada en adhesivos extracelulares secretados por células de mamíferos y el parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*. Este compuesto forma una almohadilla de adhesión entre la espora y la superficie de la planta (Robold y Hardham, 2005 y Hardham, 2007).

En otras especies de *Phytophthora*, y en especies de los géneros *Pythium*, *Plasmopara* y *Albugo*, se ha encontrado una sustancia adhesiva homóloga a PcVsv1. El hallazgo de esta proteína, conocida como Vsv1 en diversas especies de Oomycetes, sugiere que puede ser un adhesivo característico usado por este grupo de patógenos de plantas (Hardham y Shan, 2009).

Además de los adhesivos secretados por las zoosporas, se han encontrado genes que codifican para sustancias adhesivas putativas que funcionan en hifas. En *P. nicotianae* se observó la síntesis y secreción de una glicoproteína de 34 kDa que contiene dos dominios de unión a celulosa, la cual se denominó CBEL. El silenciamiento de ésta afecta la patogenicidad de la especie en plantas de tabaco (Hardham y Shan, 2009). Otra familia de proteínas que podría estar involucrada en el proceso de adhesión es la de las proteínas Car de *P. infestans* (Görnhardt *et al.*, 2000), la cuales contienen múltiples copias de un octapéptido encontrado en la mucina de mamíferos. Un papel hipotético de esta proteína, por analogía con la mucina, es la protección de la estructura germinativa frente a la desecación y daños físicos, así como la adhesión (Görnhardt *et al.*, 2000; Hardham y Shan, 2009).

Por otro lado, al analizar el genoma de *P. infestans* se encontraron siete genes codificantes de la región CBM1, que son regiones estructurales conservadas unidas

a regiones catalíticas de enzimas celulolíticas. Al estudiar otros genomas se concluyó que proteínas que contienen la región CBM1 representan un único grupo de proteínas principalmente confirmadas en Stramenopiles. Estudios de inmunolocalización indican que estas proteínas están asociadas a la pared celular de las hifas, y pueden tener actividad elicitora en la planta hospedadora (Jones y Ospina-Giraldo, 2011).

Las esporas de *Phytophthora* adheridas o enquistadas pueden germinar entre 20-30 minutos después del contacto con el tejido del hospedador. Como se ha notado que la espora toma una orientación específica, se piensa que el punto de emergencia está predeterminado y se encuentra en el centro de la superficie ventral de la zoospora. Luego de esto se observa la formación del apresorio (Hardham, 2007).

En algunos casos el tubo germinativo es considerado como un apresorio, ya que en 1975 Emmett y Parbery (citados por Hardham, 2001) propusieron un concepto bastante general de éste órgano que incluye a toda estructura que funcione para adherirse y penetrar al hospedador, considerando entonces en muchos casos al tubo germinativo como apresorio. La formación de un apresorio o de estructuras similares depende del nivel de dificultad al que se exponga la penetración en la superficie del hospedador (Hardham, 2001). Por ejemplo, las hifas de *Phytophthora* pueden penetrar la superficie de la planta a lo largo de la pared anticlinal o directamente a partir de la pared periclinal, sin detectarse cambios en la morfología de la hifa. En otros casos, sin embargo, la penetración es

antecedida por el desarrollo del apresorio. En *P. infestans*, la formación del apresorio es inducida por factores similares a los descritos para la diferenciación de estructuras en hongos fitopatógenos, incluyendo la topografía de la superficie e hidrofobicidad, y esto se ve acompañado por cambios en los patrones de expresión de genes y síntesis de proteínas (Hardham y Shan, 2009).

Al igual que los fitopatógenos fúngicos, las especies de *Phytophthora* también producen enzimas degradativas para penetrar y colonizar la planta. Las hifas de *Phytophthora* secretan un amplio grupo de enzimas que rompen los polímeros formadores de la pared celular de su hospedador, de las cuales se han podido identificar y caracterizar varios de sus genes codificantes y sus productos. Se han encontrado glucanasas, poligalacturonasas, pectinasas, esterasas, pectina liasas y xilanasas. Una de las familias de genes más estudiada incluye la de los genes codificantes de las endopoligalacturonasas, las cuales son secretadas tempranamente durante la infección y su actividad radica en macerar el tejido por ruptura de la lámina media que se encuentra entre las células hospedadoras. Esta familia contiene 20 miembros, lo cual se explica por la necesidad de contar con enzimas especializadas para la digestión de una amplia diversidad de moléculas (Hardham, 2001; Hardham y Shan, 2009).

En el ápice de las hifas se puede observar claramente, bajo la luz del microscopio óptico, la acumulación de vesículas; estas vesículas secretan al medio las sustancias degradativas, además de adhesinas y otras enzimas involucradas en la síntesis y modificación de la pared celular. El transporte y distribución de estas

vesículas depende de los componentes del citoesqueleto. En el ápice de las hifas de *Phytophthora* se ha descrito un capuchón de microfilamentos de actina, atribuyéndole la función de estabilizar la expansión apical; por lo tanto, está directamente relacionado con la invasión del medio (Hardham y Shan, 2009).

Luego de la penetración, la toma de nutrientes depende del estilo de vida del patógeno: En el caso de *P. infestans*, así como también *P. capsici*, *P. nicotianae*, *P. palmivora* y *P. sojae*, por ser parásitos hemibiotróficos, en su etapa necrotrófica las hifas pueden crecer intra e intercelularmente, adquiriendo los nutrientes necesarios a partir de células muertas. Por otro lado, en la etapa como biotrofos el crecimiento de las hifas es restringido por el apoplasto, lo cual minimiza el daño a la célula del hospedador. Para la adquisición de nutrientes, en esta etapa se desarrolla una estructura especializada denominada haustorio (Agrios, 2005; Hardham y Shan, 2009).

Se asume que el haustorio juega un papel crucial en la habilidad que tiene el parásito para competir con el desarrollo de la planta por los fotoasimilados y otros nutrientes básicos necesarios para el mantenimiento del patógeno (Szabo y Bushnell, 2001). El haustorio se forma cuando la hifa penetra la pared celular y se extiende dentro de la célula del hospedador. Sin embargo, el haustorio no se encuentra en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora; por el contrario, existe una membrana extrahaustorial que lo rodea, cuyo origen es el engrosamiento e invaginación de la membrana plasmática de la planta. Entre la membrana extrahaustorial y la pared celular del haustorio existe una capa similar a

un gel enriquecida con carbohidratos, denominada matriz extrahaustorial (Fig. 4) (Szabo y Bushnell, 2001).

El haustorio contiene el complemento normal de la célula y está rodeado por una membrana y pared celular. Por lo tanto, para el movimiento de sustancias desde la célula del hospedador al haustorio es necesario el paso a través de la matriz y membrana extrahaustorial, y la pared y membrana del haustorio (Fig. 4) (Szabo y Bushnell, 2001).

Se han realizado distintos estudios con el fin de dilucidar las funciones y los mecanismos moleculares relacionados con el haustorio. Voegelé *et al.* (2001), publican un trabajo donde demuestran que la mayoría de los genes expresados durante el desarrollo del haustorio codifican para un transportador de azúcares (HTX1), especializado para D-glucosa y D-fructosa, confirmando que estos azúcares, y no la sacarosa, son los carbohidratos primarios importados al haustorio. Adicionalmente, los autores demuestran que el transporte ocurre impulsado por una fuerza protón-motriz.

Seguidamente, se identificó una invertasa, responsable de la hidrólisis de la sacarosa y su conversión en D-glucosa y D-fructosa, haciendo posible su transporte al interior del haustorio (Voegelé *et al.*, 2001, Voegelé y Mendgen, 2003). Posteriormente, Voegelé *et al.* (2005), identificaron una alcohol deshidrogenasa en *Uromyces fabae* con especificidad por manitol. Esta enzima, localizada en el citoplasma del haustorio, también puede encontrarse a lo largo del tubo germinativo de la espora (Voegelé y Mendgen, 2003, Voegelé *et al.*, 2005). Las

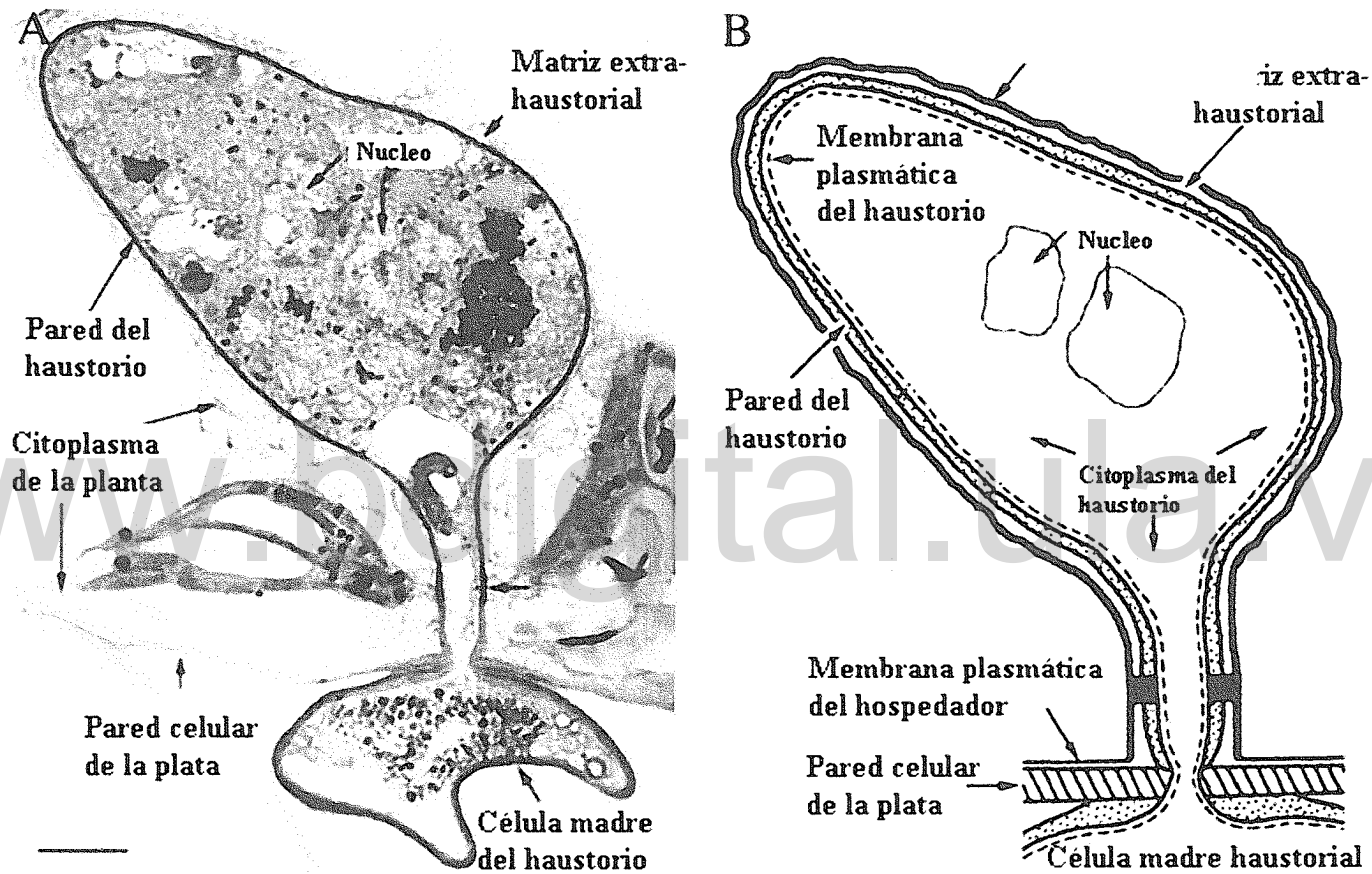


Figura 4. Complejo haustorial de patógenos fúngicos biotróficos, A. Microfotografía de transmisión del haustorio formado por la roya del lino, B. Representación esquemática del complejo haustorial (Szabo y Bushnell, 2001).

características de la enzima indican que actúa como una fructosa-reductasa, y en bajas concentraciones de fructosa y altas de manitol, la enzima puede re-convertir el manitol en fructosa, la hexosa útil para la producción de energía por el patógeno (Niehaus y Dilts, 1982). Adicionalmente, se han reportado otras importantes funciones para esta enzima y su sustrato en el proceso de interacción hospedador patógeno, lo que la convierte en un blanco ideal de investigación que se aprovecha en este trabajo.

En cuanto al transporte de aminoácidos, se detectó en el haustorio la expresión de los genes *PIGs*; estos genes codifican para transportadores secundarios putativos de aminoácidos. Por otra parte, se localizó la proteína AAT1p, específica para el transporte de L-lisina y L-histidina. La proteína homóloga AAT2p también fue caracterizada recientemente, encontrando que ambas proteínas son los principales responsables de la toma de aminoácidos por el haustorio, aunque su expresión no está limitada al haustorio, sino que también podrían encontrarse a lo largo de las hifas intercelulares (Voegelé y Mendgen, 2003).

No se ha reportado evidencia de otras funciones especializadas relacionadas con el haustorio de especies de *Phytophthora*; sin embargo, estudios de la secreción de proteínas por el haustorio han hecho una contribución para entender mejor la distribución de efectores dentro del citoplasma del hospedador (Hardham y Shan, 2009).

En general, los patógenos fúngicos poseen mecanismos de infección

conservados entre sus distintos hospedadores (Ortoneda *et al.*, 2004); por lo tanto, podríamos afirmar que el estudio de enfermedades en plantas, además de ser de inmensa utilidad en el campo de la fitopatología, puede ser utilizado para el análisis comparativo de enfermedades infecciosas en animales, incluyendo humanos— incluso en aquellos casos en los cuales el agente etiológico es un Oomycete. Por lo tanto, indagar en el mecanismo de infección de *P. infestans*, podría contribuir al estudio de la Pitiosis, con el fin de encontrar métodos eficaces para el tratamiento de dicha enfermedad.

Por otro lado, ya que es de esencial importancia para el control del patógeno conocer el origen y diversidad de la población, se han realizado varios estudios alrededor de todo el mundo con este fin. En Venezuela, se encontró que *P. infestans* está presente en zonas de cultivo de solanáceas como una población homogénea dominada por el tipo de talo A1, haplotipo mitocondrial Ia y una composición alélica uniforme, determinada por secuencias SSR (Briceño *et al.*, 2009). Inicialmente se reportó un sólo aislado (IIa) que presentó variabilidad nuclear (SSR), proveniente del estado Táchira, específicamente de la región de Las Porqueras. Posteriormente, se encontraron varios aislados provenientes de plantas de papa de otras regiones del Táchira que presentaron las mismas características del único aislado IIa. Al comparar la ubicación geográfica de estos aislados con los de la población venezolana antes reportada (principalmente Mérida), así como las características de las poblaciones del patógeno de países vecinos, se cree que existe una migración activa de nuevas poblaciones de *P. infestans* hacia nuestro país

desde Colombia, a través del estado Táchira (Ruiz, *et al.*, manuscrito en preparación). En el mismo estudio también se caracterizaron aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de tomate, y se encontraron importantes diferencias en cuanto a las secuencias alélicas estudiadas por medio de microsatélites, que permiten separar a las población del patógeno según su hospedador (Ruiz, *et al.*, manuscrito en preparación).

En este trabajo, con el fin de enriquecer los estudios previos de la población de *P. infestans* de los Andes venezolanos, se describió e incorporó al análisis un marcador molecular que no había sido reportado anteriormente, se realizó un análisis de secuencias completo para aislados encontrados en plantas de tomate en el estado Mérida, además de inocularlos en folíolos de plantas de papa, y se efectuó un análisis de la estructura genética de la población del patógeno encontrado en plantas de papa de cultivo en el estado Trujillo y en papas nativas de la región de Gavidia y Moca del estado Mérida.

Adicionalmente, como estudio previo para proponer el gen de la enzima manitol deshidrogenasa de *P. infestans* como otro marcador útil en el estudio de poblaciones de *P. infestans* y *Pythium insidiosum*, se realizó la clonación del gen codificante de esta proteína y un análisis de su secuencia. Finalmente, se llevó a cabo una comparación molecular entre *P. infestans* aislado de plantas de papa y *Pythium insidiosum* aislado de lesiones encontradas en caballos (*Equus caballus*) de Brasil a fin de verificar si es posible transferir protocolos y métodos de análisis

para el posterior estudio del patosistema *Pythium*/hospedador mamífero basado en el patosistema *Phytophthora*/Solanáceas.

Hipótesis

Dadas las siguientes premisas:

- La variabilidad genética encontrada al analizar el locus *B1* de los aislados de *P. infestans* encontrados en plantas de papa y tomate de los andes venezolanos, se corresponde con los patrones encontrados utilizando los marcadores moleculares previamente estudiados (tipo de talo, haplotipo mitocondrial, microsatélites y análisis de secuencias de genes nucleares y mitocondriales).
- Las secuencias de diversos genes de los aislados de *P. infestans* de plantas de tomate es idéntica a las reportadas anteriormente para los aislados provenientes de plantas de papa, encontradas en el mismo estado.
- La estructura genética de la población de *P. infestans* de aislados de papa de cultivo y nativas de los estados Mérida y Trujillo, es idéntica a la encontrada en estudios previos.
- El análisis de la secuencia de ADN codificante de la alcohol deshidrogenasa de *P. infestans*, permite resolver su estructura *in silico*, predecir sus funciones en este patógeno y analizar su filogenia.

- Los marcadores moleculares utilizados en el estudio de *P. infestans* son comparables con los correspondientes a *Pythium insidiosum*—razón por la cual las técnicas y cebadores empleados en el primer caso son transferibles al segundo.

Afirmamos, que el conocimiento del patosistema *Phytophthora infestans*-Solanáceas, lo cual incluye el conocimiento de la población del patógeno y de su hospedador, nos ayudará a abordar la investigación de la interacción de *Pythium insidiosum* y su hospedador mamífero.

Objetivos

I. Objetivo general

Contribuir con los estudios de *P. infestans* en los estados andinos de Venezuela y así plantear una forma de análisis para otros patógenos pertenecientes al grupo de los Oomycetes, incluyendo patógenos de humanos.

II. Objetivos específicos

1. Describir el locus *B1* como marcador molecular eficiente para evidenciar diferencias moleculares entre aislados de *P. infestans*.
2. Enriquecer el conocimiento previo de los aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida.
3. Estudiar la variabilidad genética de aislados de *P. infestans* provenientes de papas cultivadas en el estado Trujillo y plantas nativas de Gavidia y Mocoa.
4. Analizar la secuencia de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans*, a fin de

conocer su potencial como marcador molecular en el estudio poblacional de los distintos Oomycetes patógenos.

Comparar las secuencias de ciertos genes y marcadores SSR de *P. infestans* y *P. insidiosum*.

www.bdigital.ula.ve

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Análisis del locus *B1* en aislados de *Phytophthora infestans* de los Andes

venezolanos

Extracción de ADN

Se tomó con un asa la cantidad de micelio encontrada en aproximadamente 2 cm² de la superficie del cultivo del patógeno en medio sólido de harina de avena al 4% (Cedeño *et al.*, 2008), el cual se colocó en un tubo de microcentrífuga que contenía 100 µl de solución R (100 mM NaCl, 10 mM de Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA y 1% SDS) (Briceño *et al.*, 2009). El micelio se trituroó con la ayuda de un pistilo estéril, para posteriormente agregar al tubo 100µl de cloroformo; después de agitar vigorosamente, se centrifugó durante 2 minutos a máxima velocidad. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió un volumen de isopropanol al 100%; esta mezcla se centrifugó nuevamente a la misma velocidad por 5 minutos, pero en este caso se recuperó el pellet, el cual se lavó con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Seguidamente se resuspendió el ADN en 20 µl de agua destilada estéril (Sambrook y Russell, 2001).

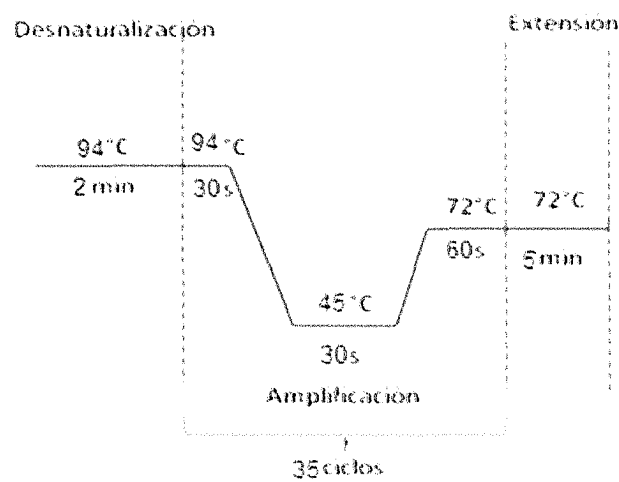
La concentración y calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, que contenían 500 ng/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100 V, por 30 minutos. El buffer con el cual se preparó el gel y se realizó la corrida fue TAE 1X (Sambrook y Russell, 2001).

Amplificación del locus B1

Con el propósito inicial de verificar la identidad del organismo en estudio y la calidad a la hora de amplificar un gen a partir del ADN total previamente extraído, se procedió a la amplificación del locus *B1*, región descrita por Judelson (1995), realizando un mapeo de los loci correspondientes al tipo de talo por medio de marcadores moleculares ligados a los caracteres A1 y A2. Esta región consta de 340 pb y está presente en ambos tipos de talo.

La amplificación de esta región se realizó mediante la técnica de PCR utilizando los iniciadores B1R y B1A2 (Judelson, 1996), preparando una mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 0,5 µl de cada uno de los iniciadores que se encontraban a una concentración de aproximadamente 150 µM, 1 µl de ADN a una concentración no menor a 10 ng/µl y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 µl.

Para la amplificación se utilizó el termociclador Applied Biosystems 2720 y el programa de ciclos de incubación fue el siguiente:



El amplicón se observó en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8 %, que contenía 500 ng/ml de bromuro de etidio. En el gel se cargaron 10 µl del producto de PCR y se utilizó una escalera de peso molecular de Axygen de 100pb (Axygen® DNA LADDER 100BP. Product #M-DNA-100bp). El buffer con el cual se preparó el gel y se realizó la corrida fue TAE 1X. La electroforesis se realizó a 100 V por aproximadamente 30 minutos, y se observó en un transiluminador UV, luego de lo cual se realizó el registro fotográfico.

Secuenciación del locus B1

Para llevar a cabo la secuenciación de los fragmentos de interés se procedió a precipitar los fragmentos amplificados con sales (Sambrook y Russell, 2001). Inicialmente, al producto de PCR se le añadió un volumen de acetato de amonio 6M, 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rcf por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y éste se lavó con etanol al 70% dos veces. Finalmente, el pellet, luego de secarse a temperatura ambiente, se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril. Con el fin de verificar la calidad de la purificación se procedió a visualizar el producto precipitado cargando 1µl en un gel horizontal de agarosa al 0,8%, con bromuro de etidio.

Los fragmentos de ADN se enviaron a secuenciar en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las secuencias producidas fueron visualizadas y editadas usando BioEdit (Hall, 1999) y el alineamiento de las

mismas se llevó a cabo usando el programa ClustalX versión 2.0 (Thompson *et al.*, 1997).

Análisis de restricción

Al analizar las secuencias de ADN obtenidas se encontró para algunos aislados (figura 7) una región indel de 25 pb y con el fin de ponerla en evidencia en los aislados en estudio, se realizó un análisis de restricción. Inicialmente, se hizo una simulación *in silico* con ayuda del programa pDRAW32 1.0 (AcaClone Software, <http://www.acaclone.com/>) y la herramienta NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003), donde se escogieron las enzima *TaqI* y *Fnu4HI* para el análisis, ya que al tener sitios de corte específicos dentro de la secuencia indel encontrada, permiten, mediante un patrón de bandeo en electroforesis en gel de agarosa, identificar aislados que presenten variaciones en dicha secuencia.

Para esto se realizó la amplificación del locus *B1* bajo las mismas condiciones que en el caso anterior, y el producto de PCR fue sometido a la restricción con la enzima correspondiente, utilizando la siguiente mezcla de reacción:

Enzima de restricción (10 U/ μ l)	0,28 μ l
BSA (10mg/ml)	0,50 μ l
Buffer correspondiente a la enzima (10X)	2,00 μ l
Amplificado (≥ 100 ng)	5,00 μ l
Agua libre de nucleasas	12,22 μ l

Los resultados se verificaron en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio. En los pozos del gel se cargaron 10 µl de la mezcla de restricción y se utilizó como marcador molecular el 1kb DNA Step Ladder (Promega, Cat. G6941).

II. Caracterización de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida

a) Ensayo de infección de folíolos de papa con aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida

Material vegetal

Se utilizaron hojas sanas de papa de las variedades R-12 y Granola, que fueron colectados en El Valle y Santa Rosa, Municipio Libertador del estado Mérida. Se cortó la 3^{era} hoja descendente de aproximadamente 40 plantas, las cuales se introdujeron en bolsas de plástico que se cerraron dejando aire en su interior y se guardaron en cavas con bolsas de hielo en su interior para ser trasladadas al laboratorio donde se realizó la infección. De las hojas llevadas al laboratorio, tomando en cuenta el tamaño y la edad, se escogieron los mejores folíolos. En algunos casos se utilizaron folíolos individuales y en el caso de hojas más jóvenes se utilizaron el primer trío de folíolos de la hoja. Éstos se lavaron con agua corriente por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, se procedió a su esterilización, que consistió en tres lavados, el primero con hipoclorito de sodio al 0,5% y el segundo y el último con agua destilada estéril. Luego cada folíolo se secó

cuidadosamente con papel absorbente estéril y se colocaron con el envés hacia arriba en las cámaras de inoculación. Como soporte para los foliolos se utilizaron cápsulas de Petri, con el fin de que no estuvieran en contacto directo con la superficie de la cámara de inoculación.

Preparación de las cámaras de inoculación

Se utilizaron envases de plástico con tapa hermética, que previamente fueron lavados con etanol al 70 %, para posteriormente en cada uno de ellos colocar diez servilletas de papel estéril, las cuales se humedecieron con aproximadamente 200ml de agua destilada estéril.

Preparación del inóculo

Se prepararon cultivos frescos de cada uno de los aislados de *P. infestans* seleccionados para el ensayo en placas conteniendo medio agarizado de guisantes, el cual contiene 12 % de guisantes, 5 % de sacarosa y 1,5 % de agar (Cedeño *et al.*, 2008). Cuando se observó un buen crecimiento de los aislados se procedió a la verificación de la presencia de zoosporangios bajo el microscopio, tomando una pequeña porción del medio, que sobre un portaobjetos se tiñó con lactofuccina. Para el caso de los aislados de *P. infestans* provenientes de tomate, fueron necesarias aproximadamente 4 semanas para la obtención de un buen número de zoosporangios, mientras que para el caso del aislado control, proveniente de papa, solo fueron necesarios 10 días.

Luego de verificar la presencia de zoosporangios, se procedió a preparar una suspensión. Esto se logró raspando la superficie del medio de cultivo con un pincel estéril y sacudiéndolo dentro de un tubo de microcentrífuga que contenía 500 μ l de agua destilada estéril. El título de esta suspensión se calculó colocando una gota de 10 μ l en una cámara de Newbauer, se contaron los zoosporangios en cinco cuadrantes y se tomo el promedio. El valor obtenido se multiplicó por 1×10^4 . En todos los casos el título de la suspensión se llevó a aproximadamente 100 zoosporangios/ μ l.

Inoculación

En condiciones estériles, sobre la superficie de cada foliolo se procedió a colocar dos gotas de 10 μ l de la suspensión de zoosporangios, una de cada lado del foliolo, dentro de aros de meta fijados con vaselina, con el fin de evitar escurrimiento de la gota. En cada foliolo se inoculó un aislado distinto y se realizaron cuatro repeticiones. Las cámaras se incubaron a 18 °C en condiciones de oscuridad. Como control se inocularon hojas con un aislado proveniente de papa, y el control negativo se realizó inoculando los foliolos con agua destilada estéril (Boscán, 2009).

Se realizaron registros fotográficos cada 24 horas por 144 horas y se midió el diámetro de la lesión a partir de 72 horas luego de la inoculación. Se verificó la presencia de zoosporangios de *P. infestans* en las lesiones observadas bajo el

microscopio realizando un montaje *in situ*, con el método de toma de micelio con cinta adhesiva y usando como colorante lactofuccina al 0,025%.

b) Análisis de las secuencias de distintos genes de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida

Amplificación por PCR

Posterior a la extracción de ADN total mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, con el fin de comparar la secuencia de distintos genes nucleares y mitocondriales, entre los aislados de *P. infestans* provenientes de tomates colectados en el estado Mérida, con las reportadas anteriormente para aislados de papa procedentes de Los Andes venezolanos (Briceño *et al.*, 2009; Cárdenas *et al.*, 2011), se procedió a la amplificación y posterior secuenciación de varios genes. Los primers utilizados se muestran en la Tabla 2.

La mezcla de reacción consistió en 0,4 µl de ADN ($\geq 10\text{ ng}/\mu\text{l}$), 0,2 µl de cada primer ($\approx 100\mu\text{M}$), 5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega) y de la cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen de 10 µl. Para la amplificación se utilizó un termociclador Applied Biosystems 2720 y el perfil de PCR se adaptó a cada caso según el *T_m* de los primers.

Los fragmentos obtenidos se evaluaron realizando una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8 %, con 500 ng/ml de bromuro de etidio y TAE 1x como tampón de preparación del gel y de corrida (Sambrook y Russell, 2011).

Directamente en los pozos del gel se cargaron 5 µl del producto de PCR y se utilizaron los marcadores moleculares 1 kb DNA Step Ladder (Promega, Cat. G6941) y 100 pb DNA Step Ladder (Promega, Cat.G2101).

Tabla 2. Iniciadores usados para el análisis de secuencias de los aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de tomate del estado Mérida.

Blanco en el ADN	Primer	Secuencia	Tamaño del amplificado	Referencia
Ras	RasF	5'-CGTGCTCTGCTTCTCCGTTTCG	600 pb	Gomez <i>et al.</i> , 2003
	RasR	5'-CCAGGCTTTTCGGCAAATTC-		
Locus B1	B1A2	5'-CCCTCCTCCGGCAGAGTCT-	340 pb	Judelson, 1996
	B1R	5'-CGCTCCCGTTGTAGCACCAATAAT-		
Citocromo oxidasa C	P4	5'-TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT-3'	964 pb	Griffith y Shaw, 1998
Subunidad 1 (Cox I)	R4	5'-CCGATACCGATACCAGCACCAAS'	750 pb	White <i>et al.</i> , 1990
ITS (Internal transcribed spacer)	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-		
	ITS4	5'-TCTCTCCGCTTATTGATATGC-		
Aw3a	Pex147F	5'-CCATGCGTCTGGCAATTATGCT-3	440 pb	Restrepo, comunicación personal
	Pex147R	5'-CTGAAAACCTAATATCCAGTGA-3		

Secuenciación de los fragmentos amplificados

Para llevar a cabo la secuenciación de los fragmentos de interés se procedió a precipitar los fragmentos amplificados con sales (Sambrook y Russell, 2001). Inicialmente, al producto de PCR se le añadió un volumen de acetato de amonio 6 M, 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rcf por 10 minutos, se recuperó el

sobrenadante y éste se lavó con etanol al 70 %, en dos oportunidades. Finalmente, el pellet, luego de secarse a temperatura ambiente, se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril. Con el fin de verificar la calidad de la purificación se procedió a visualizar el producto precipitado cargando 1 µl en un gel horizontal de agarosa al 0,8 %, con bromuro de etidio, como en el caso anterior.

Los fragmentos de ADN se enviaron a secuenciar en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las secuencias producidas fueron analizadas utilizando el software BLAST (Zhang *et al.*, 2000) y comparadas con las obtenidas anteriormente para los aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de papa de los Andes venezolanos. Los productos fueron visualizados y editados usando BioEdit (Hall, 1999) y el alineamiento de las secuencias se elaboró usando el programa ClustalX versión 2.0 (Thompson *et al.*, 1997).

III. Estructura genética de la población de *Phytophthora infestans* presente en papas cultivadas en el estado Trujillo y papas nativas del estado Mérida

Material biológico

Se utilizaron 40 aislados de *P. infestans* provenientes de Cabimbú (2.700 msnm), Marajabú (2.100 msnm) y el Páramo de Ortiz (1.800 msnm), regiones productoras de papa del estado Trujillo que fueron colectados en el año 2007, y 6 aislados provenientes de las regiones de Gavidia y Mocoa del estado Mérida, colectados en el mismo año (Para información de los aislados utilizados ver anexo 1). Este material fue proporcionado por la colección del Laboratorio de

Biodiversidad y Variabilidad Molecular del Instituto Jardín Botánico de la Universidad de Los Andes. Los aislamientos utilizados inicialmente fueron procesados a partir de folíolos de plantas de papa de cultivo de diferentes variedades, que presentaron síntomas y signos de la candelilla tardía, y almacenados a 4 °C, en cuñas de medio agarizado de harina de avena al 4%. Antes de la extracción de ADN de cada aislado de *P. infestans* analizado el micelio fue reactivado utilizando el mismo medio de cultivo mencionado (Cedeño *et al.*, 2008).

Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados analizados se realizó utilizando el mismo método que en el apartado I de esta sección.

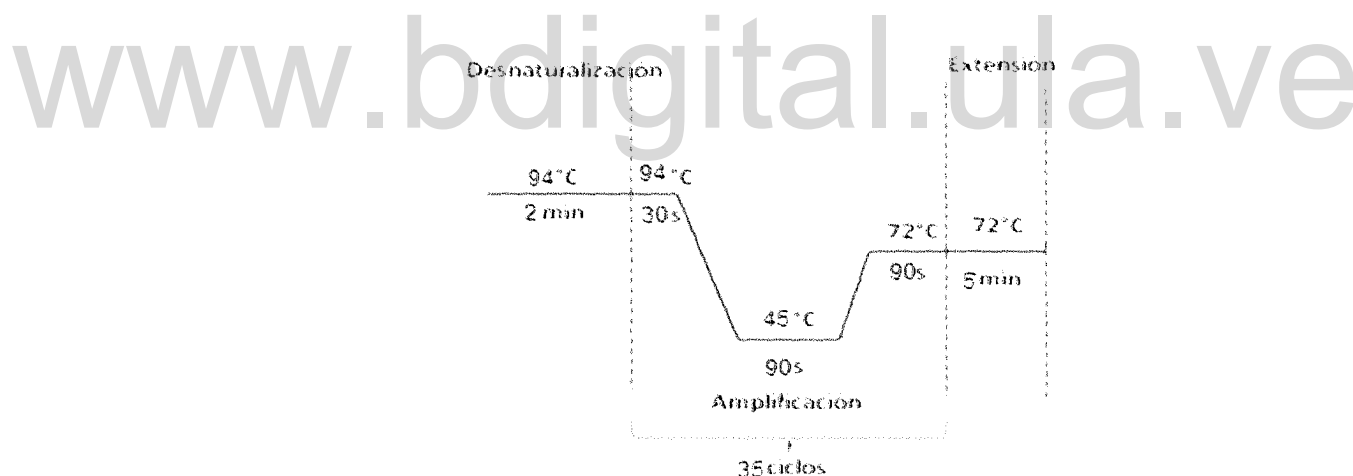
Tipo de talo

La determinación del tipo de talo de un aislado de *P. infestans* puede lograrse mediante dos métodos distintos. Una prueba biológica, que consiste en la observación de la formación de oosporas luego del enfrentamiento en cajas de cultivo del talo problema con un talo referencial, y una prueba molecular basada en la amplificación de loci específicos. En este trabajo se estableció el tipo de talo mediante la amplificación por PCR de una secuencia ligada al locus de apareamiento, con el uso de los iniciadores denominados S1A y S2B, los cuales amplifican el locus *S1* en los aislados con tipo de apareamiento A1 (Judelson, 1996).

Amplificación del locus S1

Los iniciadores usados en este caso fueron S1A (5'-AGGATTTCACAA-3') y S1B (5'-TGCTTCCTAAGG-3'), los cuales se diseñaron para amplificar una región de 1350 pb, ligada al tipo de talo A1 (Judelson, 1996).

Para la obtención del amplicón del locus S1, se preparó una mezcla de reacción que consistió en 5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,4 µl de ADN ($\geq 10\text{ng}/\mu\text{l}$), 0,2 µl de cada primer ($\approx 100\mu\text{M}$), y de la cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen de 10 µl, la cual se sometió al programa de ciclos de incubación que se muestra a continuación:



Igual que en el caso anterior, para la amplificación se usó un termociclador Applied Biosystems 2720 y el fragmento amplificado se observó realizando una electroforesis, utilizando el mismo método que en el procedimiento ya descrito.

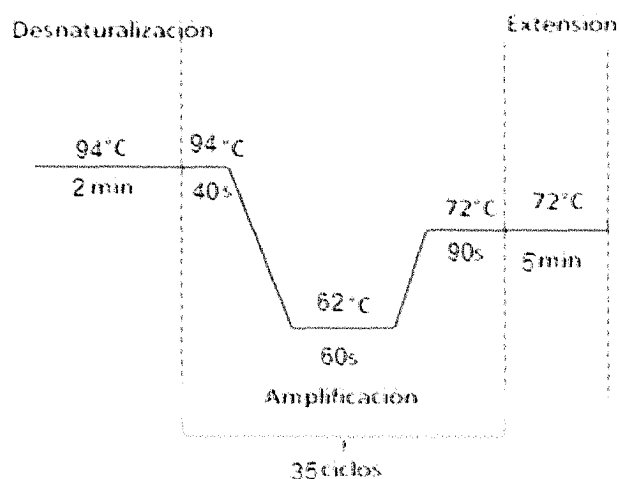
Haplotipo mitocondrial

Para la determinación del haplotipo mitocondrial se utilizó el método diseñado por Griffith y Shaw (1998), el cual consiste en la amplificación por PCR y posterior digestión con enzimas de restricción de una de las cuatro regiones del genoma mitocondrial de *P. infestans* descritas por estos autores. En este trabajo se amplificó la región P2, y se trató con la enzima de digestión *MspI*.

Amplificación por PCR

El amplicón P2 se obtuvo con los cebadores denominados F2 (5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT-3') y R2 (5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA).

La mezcla de reacción utilizada mantuvo las proporciones de las amplificaciones anteriores y el programa de ciclos de incubación fue el siguiente:



Se utilizó un termociclador Applied Biosystems 2720. Al finalizar la amplificación los fragmentos obtenidos se evaluaron realizando una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%, en las mismas condiciones que en el caso anterior.

Digestión con MspI

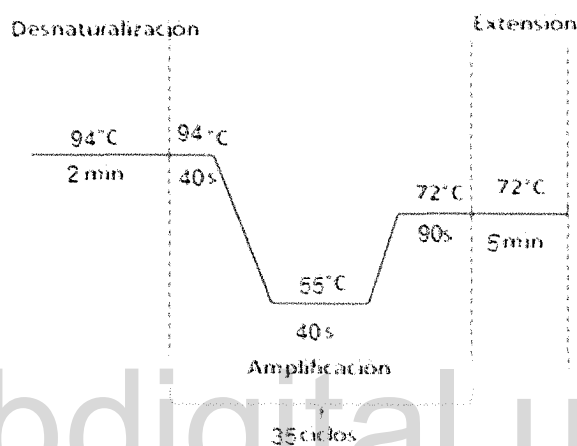
El producto de amplificación obtenido en el paso anterior fue digerido con la enzima *MspI* (C'CGG), utilizando la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

<i>MspI</i> (10 U/ μ l)	0,1 μ l
BSA (10mg/ml)	0,2 μ l
Buffer B (10X)	2,0 μ l
Amplificado (≥ 100 ng)	5,0 μ l
Agua destilada estéril	12,7 μ l

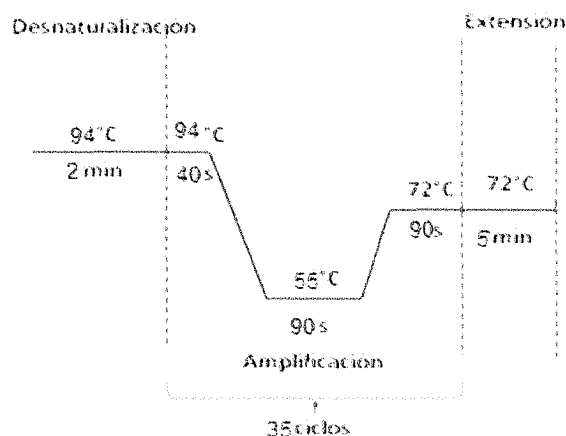
La incubación de la mezcla de reacción se llevó a cabo toda la noche a 37°C, y la eficiencia de la reacción y el tamaño de los productos se observaron en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % con 500 ng/ml de bromuro de etidio. Se cargaron 20 μ l del producto de digestión y se utilizó una escalera de peso molecular de Axygen de 100pb (Axygen® DNA LADDER 100BP. Product #M-DNA-100bp).

Caracterización mediante el uso de microsatélites

Se procedió a la amplificación por PCR de los marcadores microsatelitales descritos por Knapova *et al.* en el 2001. La secuencia de los cebadores y el tamaño del fragmento esperado en cada caso se muestran en la Tabla 3. El programa de ciclos de incubación para los cebadores Pi4G y PiG11 fue el siguiente:



Para los primers denominados Pi4B y Pi2H la amplificación se logró con el siguiente programa:



Se trabajó en un termociclador Applied Biosystems 2720. La amplificación y el tamaño de los fragmentos se verificaron en un gel de electroforesis horizontal de agarosa al 2,5 %, con 500 ng/ml de bromuro de etidio, en el cual se cargaron 20 µl de cada reacción. La escalera de peso molecular seleccionada fue de 50 pb (PROMEGA Cat. G4521). La corrida se realizó a 100 V por aproximadamente 45 minutos; el gel de electroforesis se observó en un transiluminador UV y se realizó el respectivo registro fotográfico.

Con el fin de analizar los datos obtenidos se elaboraron matrices binarias de presencia/ausencia de amplicones por cada locus SSR para todos los aislados, las cuales fueron analizadas con el programa Popgen 32 versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

Tabla 3. Microsatélites, secuencia de los cebadores y longitud del producto de PCR reportados para *Phytophthora infestans* (Knapova *et al.*, 2001).

Locus	Secuencia del primer	Longitud del producto de PCR (pb)
Pi4B	F:5'- AAAATAAAGCCTTTGGTTCA -3'	218
	R:5'-GCAAGCGAGGTTTGTAGATT -3'	
Pi4G	F:5'- CGCTGTGTGGATGACAAGTA-3'	159
	R:5'- TCGACCTGACATACGAGCTA-3'	
PiG11	F:5'- TGCTATTTATCAAGCGTGGG-3'	156
	R:5'- TACAATCTGCAGCCGTAAGA-3'	
Pi2H	F:5'-TTCTTCACACTTTCACGCTG -3'	132
	R:5'- GCTGTTGTGTGTATCGTTGC-3'	

IV. Marcador candidato: estudio del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*

Material biológico

Se usó un aislado de *P. infestans* proveniente de Santa Rosa, municipio libertador, estado Mérida, encontrado en el año 2005, el cual fue obtenido a partir de folíolos de plantas de papa que presentaron los síntomas y signos de infección por el patógeno. Este aislado fue identificado mediante los métodos clásicos y por medio de análisis molecular. También fue caracterizado genéticamente, y hasta el momento ha sido almacenado en cuñas con medio de cultivo harina de avena al 4% (Cedeño *et al.*, 2008) a una temperatura de 4°C, siendo reactivado frecuentemente. Se utilizó este aislado por ser autofértil, permitiendo hacer análisis en cualquier estadio del ciclo de vida del patógeno.

Clonación del gen de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans*

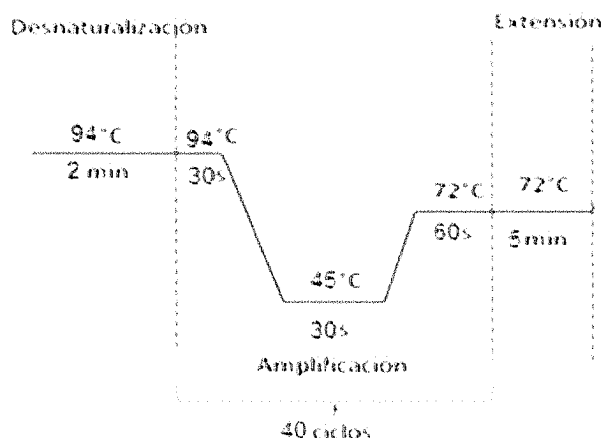
La clonación del gen de interés se realizó mediante el proceso de clonación TA o clonación del producto de PCR, comenzando con la amplificación directa del gen a partir de ADN total extraído del micelio del patógeno, mediante el protocolo descrito anteriormente.

La concentración y calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, que contenía 500 ng/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100 V, por 30 minutos. El buffer con el cual se preparó el gel y se realizó la corrida fue TAE 1X (Sambrook y Russell, 2001). Para la

visualización del ADN total en el gel de electroforesis se usó un transiluminador UV y se realizó el registro fotográfico pertinente. Para la amplificación del gen se utilizaron los iniciadores mtlF (5'-ATGTTGCGCTTCGTGTCCCG-3') y mtlR (5'-TTACTTAAGCACAGTCCAGA-3'), diseñados previamente con la Licda. Yarúa Jaimes, bajo la supervisión del Dr. Gustavo Fermin, preparando una mezcla de reacción con 12,5 µl de GoTaq®Green Master Mix (Promega), 0,5 µl de cada uno de los iniciadores, los cuales se prepararon a una concentración de aproximadamente 174 µM; del ADN del patógeno se agregó 1 µl el cual se encontraba a una concentración ≥ 10 ng/µl, 2,5 µl de MgCl₂ al 25 mM (cantidad que se estandarizó previamente, probando distintas concentraciones finales de la solución que fueron desde 1,5 a 4 mM), y la cantidad de agua suficiente para completar 25 µl.

Los iniciadores utilizados están diseñados para amplificar una región de 1233 pb, que se observó en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8 %, que contenía 500 ng/ml de bromuro de etidio. En el gel se cargaron 10 µl del producto de PCR y la escalera de peso molecular utilizada fue el 1kb DNA Step Ladder (Promega, Cat. G6941). El buffer con el cual se preparó el gel y se realizó la corrida fue TAE 1X. La electroforesis se realizó a 100 V, por aproximadamente 30 minutos, se observó en un transiluminador UV para realizar el registro fotográfico.

Para la amplificación se utilizó el termociclador Applied Biosystems 2720 y el programa de ciclos de incubación fue el siguiente:



Para la clonación se utilizó el sistema pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA, Cat. A1360), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, para lograr clonar el gen.

Con la mezcla de ligación se transformó la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1 andA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac^f ZAM15 Tn10 (Tet^r)]*), a la cual se le indujo la competencia usando polietilenglicol (Chung *et al.*, 1989). Este método consiste en resuspender las células que han crecido en medio de cultivo Luria-Bertani (1% de peptona, 0,5% de extracto de levadura y 1% de NaCl) hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0,3 a 0,4, en una solución denominada TSS que contiene 1,96g de polietilenglicol MW=8000, 10mM MgSO₄, 10mM de MgCl₂, 0,88ml de DMSO y la cantidad suficiente de medio de cultivo Luria-Bertani para completar 20ml. Es importante destacar que el inóculo utilizado para cultivar las células hasta la concentración necesaria, se tomó de un cultivo fresco que se dejó crecer toda la noche anterior al procedimiento.

La transformación se realizó transfiriendo 200 µl de las células previamente tratadas con TSS a tubos estériles, donde se agregaron no más de 5 µl de la mezcla

de ligación, se mezcló por inmersión y se colocó en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se transfirieron los tubos a un baño de María a 42°C por 90 segundos y rápidamente se colocaron en hielo por 1 a 2 minutos, para luego agregar 800 µl de medio de cultivo Luria-Bertani e incubar por 90 minutos a 37 °C con agitación. Finalmente, se sembraron por la técnica de extensión de superficie o rastrillado de 100 µl de la mezcla de transformación en placas de Petri conteniendo medio agarizado Luria-Bertani suplementado con 40 µl de X-gal al 2%, 7 µl de IPTG al 20%, y 100 µg/ml de ampicilina como marcador de selección.

La confirmación de la presencia del inserto en el vector de clonación se logró mediante la amplificación por PCR de colonia del gen a partir de colonias blancas que crecieron en el medio de cultivo conteniendo ampicilina como marcador de selección (tomando en cuenta la selección por alfa complementación que aporta el sistema de clonación). El PCR de colonia se realizó inoculando la mezcla de reacción para amplificación del gen codificante de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans* antes descrita, con la colonia bacteriana de interés, tocándola con una punta de micropipeta estéril y sacudiéndola en la mezcla de reacción. El perfil de PCR se mantuvo idéntico que en el caso anterior con la excepción de que el ciclo inicial de 94°C se extendió por 5 minutos. Las colonias de las cuales se obtuvo amplificación del gen de interés se cultivaron en medio agarizado para su almacenamiento y líquido para la posterior extracción de ADN plasmídico según el método de lisis alcalina (Sambrook y Russel, 2001).

Posteriormente, se sub-clonó el gen cortando con enzimas de restricción específicas (*Sall*, *NcoI* y *EcoRI*) el fragmento de interés y ligándolo en los vectores de expresión Pet21d(+) y pET28a. La mezcla de ligación se realizó utilizando la ADN ligasa de T4 (INVITROGEN Cat.# 15224-017), buffer de ligación 5X, y se probaron distintas concentraciones del inserto y del vector de expresión. El inserto, luego de ser escindido del vector de clonación con las enzimas específicas, se purificó a partir del gel de electroforesis con el Kit *Gel/PCR purification* de FAVORGEN (Cat. FAGCK001), para posteriormente colocarlo en la mezcla de ligación.

Con dicha mezcla fueron transformadas células de *E. coli* BL21(DE3) (*fhuA2* [*lon*] *ompT* *gal* (λ DE3) [*dcm*] Δ *hsdS* (λ DE3= λ *sBamHlo* Δ *EcoRI-B* *int::(lacI::PlacUV5::T7 gene 1) i21* Δ *ini5*)), cepa adecuada para la expresión de proteínas, utilizando el sistema T7 de rutina), y se confirmó la presencia y sentido del inserto por medio de PCR de colonia, PCR convencional y la digestión con enzimas de restricción, luego de la extracción de ADN plasmídico. Para confirmar el sentido del inserto ligado al vector de expresión pET28a se utilizaron las enzimas *Sall*, la cual lineariza el vector, y la enzima *XhoI* que corta al inserto en dos puntos permitiendo verificar el sentido de la secuencia. Estas enzimas fueron elegidas realizando análisis de restricción *in silico* de la secuencia del gen utilizando la herramienta de NEBcutter versión 2.0 (Vincze *et al.*, 2003). Adicionalmente, se realizó la secuenciación del inserto a partir del vector de

expresión con el fin de verificar el marco de lectura del gen y la presencia del promotor, comparando con la secuencia reportada del vector.

Ensayos de expresión de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans*

Inicialmente se probó la expresión heteróloga de la enzima en estudio por medio de la inducción con IPTG y visualización electroforética de proteínas totales. El procedimiento comienza con la inoculación de medio de cultivo líquido Luria-Bertani+antibióticos con la cepa portadora del inserto sentido y como controles del ensayo la cepa con el inserto antisentido, la cepa con el vector sin inserto y la cepa sin vector. Estos cultivos se dejaron en agitación a 37°C toda la noche, para luego a partir de este inóculo inicial, realizar una dilución 1:100 y crecer las cepas a 37°C con agitación, monitoreando el crecimiento periódicamente hasta, luego de aproximadamente dos horas, alcanzar la fase de crecimiento exponencial (D.O._{600nm} de 0.5-0.8). Posteriormente, de cada una de las cepas se realizaron dos alícuotas, una de las cuales se trato con IPTG al 0.5 mM por 4 horas a 25 °C. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 µl de buffer de carga con SDS (50 mM de Tris-Cl pH 6.8, 100 mM de dithiothreitol, 2 % de SDS, 0.1 % de azul de bromofenol y 10 % de glicerol) y se calentaron a 100 °C por 3 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras por 1 minuto y se colocaron en hielo hasta el momento de la electroforesis. La electroforesis se realizó según el protocolo de Sambrook y Russell (2001) (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*) usando un gel al 8% de poliacrilamida, en la cámara para electroforesis de

proteínas Bio Rad Mini-PROTEAN®3Cell (Cat. 165-3301). La corrida electroforética se realizó por 1 hora y 30 minutos a 120V. También se realizaron ensayos para medir la actividad de la enzima en geles nativos de poliacrilamida, usando manitol y etanol, por separado, como sustratos. Las muestras se prepararon de la misma manera que en el protocolo anterior, pero, esta vez el tampón de carga consistió en 0,5 M de Tris-Cl pH 6.8, 0,3 % de glicerol y 0.1 % de azul de bromofenol y no se calentaron las muestras, sino que se logró la ruptura celular, congelando las muestras con nitrógeno líquido y macerando el cultivo con un pistilo estéril (Benov y Al-Ibraheem, 2002). El gel nativo se realizó según las especificación del equipo Bio Rad Mini-PROTEAN®3Cell (Cat. 165-3301), preparando un gel de poliacrilamida al 8%, el cual se sometió a 120 V por 1 hora y 30 minutos. Luego de la corrida electroforética el gel se sumergió por 30-60 minutos en 50ml de una solución que contenía: 20 mM de Tris-Cl, 2 mM de MgSO₄, 150 µl de NADP⁺ 12 mM, 100 µl de MTT 14.5 mM, 150 µl de manitol o etanol 50 mM y 9 µl de PMS 6.5 mM, la cual se probó a pH, 6, 7, 8 y 9.5 (Moreno, 2006).

Secuenciación del gen de la manitol deshidrogenasa de P. infestans

La secuencia del gen se obtuvo luego de la precipitación con sales del producto de PCR del gen clonado y la extracción de ADN plasmídico de pGEM-T/mtl y pET28a/mtl (Sambrook y Russell, 2001). Posteriormente las muestras de ADN se enviaron a secuenciar a Alabama-EEUU (Eurofins mwg/Operon). La secuenciación se logró con el uso de los iniciadores específicos descritos

anteriormente para el caso del producto de PCR y con los iniciadores universales M13, cuando el fragmento de interés se envió ligado a los vectores.

Análisis de secuencias y modelado de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans*

La secuencia obtenida inicialmente fue analizada usando el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall *et al.*, 1999), donde se verificó la integridad de la secuencia comparándola con el cromatograma facilitado por la compañía de secuenciación y se obtuvo el contig de la secuencia, con el que posteriormente se realizó una comparación con las secuencias reportadas utilizando el programa Blast (Zhang *et al.*, 2000). Utilizando las herramientas de los portales web NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) y ExPASy (<http://www.expasy.org/>) se analizó la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, logrando obtener un árbol filogenético realizado en el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2007) y el modelo tridimensional de la enzima fue construido utilizando el Swiss-Model (Arnald *et al.*, 2006).

V. Comparación molecular entre aislados de *Phytophthora infestans* y *Pythium insidiosum*

Se utilizó ADN proveniente de seis aislados de *Pythium insidiosum* provenientes de tejido infectado de caballo (*Equus caballus*) que fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Eduardo Bagagli, del Departamento de Microbiología e Inmunología del Instituto de Biociencias, UNESP, São Paulo, Brasil.

Amplificación por PCR y análisis del locus B1

Para el análisis de los aislados de *Pythium insidiosum* se probaron los iniciadores que se han usado para describir poblaciones de *P. infestans*. Los iniciadores utilizados se muestran en la Tabla 4 y la mezcla de reacción que se utilizó es la siguiente: 12,5µl de GoTaq®Green Master Mix (Promega), 0,5 µl de cada uno de los iniciadores, los cuales se prepararon a una concentración de aproximadamente 100 µM; del ADN del patógeno se agregó 1 µl el cual se encontraba a una concentración $\geq 10\text{ng}/\mu\text{l}$, y la cantidad de agua suficiente para completar 25 µl. El programa de ciclos de incubación se adaptó a la temperatura de anillamiento de los iniciadores. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems 2720 y el resultado se verificó como en los casos anteriores. El análisis de la región B1 del genoma de *Pythium insidiosum* se realizó mediante el mismo procedimiento utilizado para *P. infestans* descrito en el apartado I. Se utilizaron como controles aislados de *P. infestans* que mostraron los patrones encontrados anteriormente.

Caracterización mediante el uso de microsatélites

Se analizaron los microsatélites descritos para *P. infestans* empleando los primers propuestos por Knapova *et al.* (2001), cuya secuencia se muestra en la Tabla 3. El método utilizado para su estudio fue el mismo descrito en el apartado IV, con controles de ADN extraído a partir de distintos aislados de *P. infestans*.

Tabla 4. Iniciadores usados para el análisis de aislados de *Pythium insidiosum*.

Blanco en el ADN	Primer	Secuencia	Tamaño del amplificado	Referencia
Ras	RasF	5'-CGTCTCTGCTTCTTCGGTTTGG	600 pb	Gomez <i>et al.</i> , 2003
	RasR	5'-CCAGGCTTTGCGCAAAATTCC-		
MDR	mtF	5'-ATGTTGGGCTTGGTGTCCCG-3'	1200 pb	Fermín, comunicación personal
	mtR	5'-ATGTTGGGCTTGGTGTCCCG-3'		
Citocromo oxidasa C	F4	5'-TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT-3'	964 pb	Griffith y Shaw, 1998
Subunidad 1 (Coa2)	R4	5'-CCGATACCGATACCAGCAACAA-3'		
ITS (internal transcribed spacer)	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-	750 pb	White <i>et al.</i> 1990
	ITS4	5'-TCCGCGGCTTATTGATATGC-		
Aox3a	Pex147F	5'-CCATGCGTCTGGCAATTATGCT-3'	440 pb	Restrepo, comunicación personal
	Pex147R	5'-CTGAAAACCTAATATCCAGTGA-3'		

RESULTADOS

I. Análisis del locus *B1* de *Phytophthora infestans* de los Andes venezolanos

Extracción de ADN total, y amplificación y secuenciación del locus B1

El método utilizado para el aislamiento del ADN permitió obtener moldes íntegros y a una concentración adecuada para la realización de los ensayos posteriores (Fig. 5), lo cual garantizó la amplificación exitosa del locus *B1* del cual se logró obtener una única banda de aproximadamente 350 pb (Fig. 6). Los amplicones obtenidos fueron purificados y enviados a secuenciar, obteniendo las secuencias en dos tipos de archivos, un archivo que puede ser editado como texto plano (archivo tipo SEQ) y un cromatograma (archivo tipo AB1). Dichos archivos fueron visualizados y editados usando el software BioEdit (Hall *et al.*, 1999) y el editor de texto plan Textpad 7.2.0 (Helios Software Solution, 1992), obteniendo así los contigs de las secuencias para posteriores alineamientos. Adicionalmente, fueron analizadas por el programa BLAST (Zhang, et al., 2000), sin obtener resultados, ya que las secuencias de este gen no han sido reportadas hasta el momento. Es decir, en este trabajo reportamos por primera vez la secuencia de un locus que en el pasado sólo había sido empleado para ensayos de ausencia/presencia en la caracterización de poblaciones del patógeno.

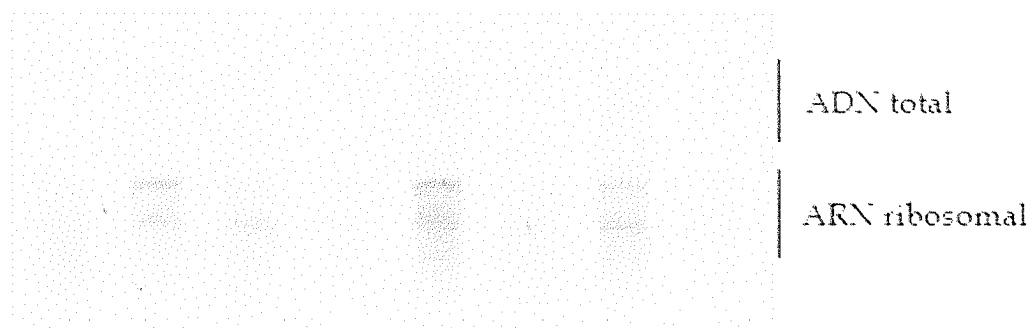


Figura 5. Electroforesis de ADN total extraído de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de papa del estado Trujillo (Foto representativa).

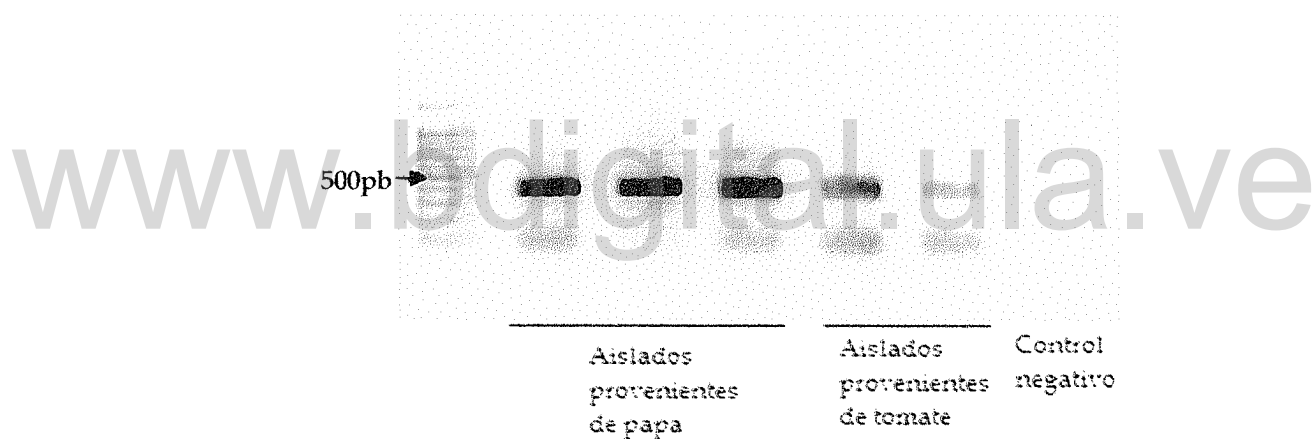


Figura 6. Amplificación por PCR del locus *B1* a partir del ADN total extraído de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de planta de papa y tomate. Muestras 1,2 y 3 amplicones a partir de aislados de plantas de papa, muestras 4 y 5 amplicones a partir de aislados de tomate.

En cuanto al alineamiento de los genes secuenciados para esta región, se encontró tanto en los aislados de *P. infestans* provenientes de tomate como en los provenientes de papa, que coinciden en cuanto al haplotipo mitocondrial IIa, una inserción de 25 nucleótidos (se tomó como inserción para fines del análisis, es necesario hacer otros ensayos para comprobar esta suposición), no presente en aquellos aislados de haplotipo mitocondrial Ia (Fig. 7).

Análisis de restricción

Basado en este polimorfismo no reportado anteriormente en la literatura relativa al marcador *B1*, se analizaron distintos aislados provenientes de papas cultivadas en Mérida y Táchira, además de los aislados provenientes de planta de tomate, por digestión del amplicón del locus. En la población analizada se encontró en todos los aislados provenientes de tomate, los aislados de papa colectados en el páramo de El Tamá y para un aislado proveniente de “Las Porqueras” (edo. Táchira) un patrón de bandeo de fragmentos coincidente que no presentan la inserción (figura 7).

En el caso de los aislados de papa, los resultados coincidieron con los encontrados para el haplotipo mitocondrial: es decir, los aislados que presentan un haplotipo Ia muestran el patrón de restricción asociado a la inserción, mientras que los aislados que mitocondrialmente corresponden al haplotipo IIa mostraron un patrón distinto (Fig. 8). Como controles se usaron los aislados referenciales A1 y A2 para descartar que las diferencias estuvieran relacionadas con el tipo de talo.

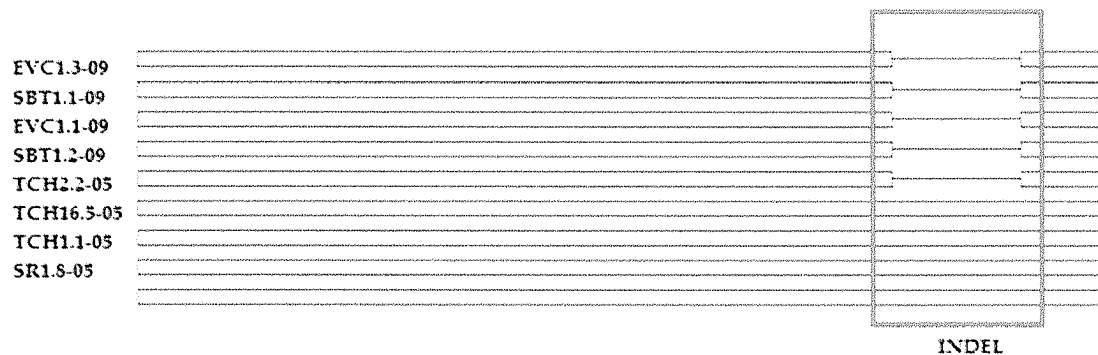


Figura 7. Representación esquemática del alineamiento de las secuencias amplificadas del loci *B1* de distintos aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de papa y tomate de los Andes venezolanos (códigos y características genéticas de los aislados en anexo 1).

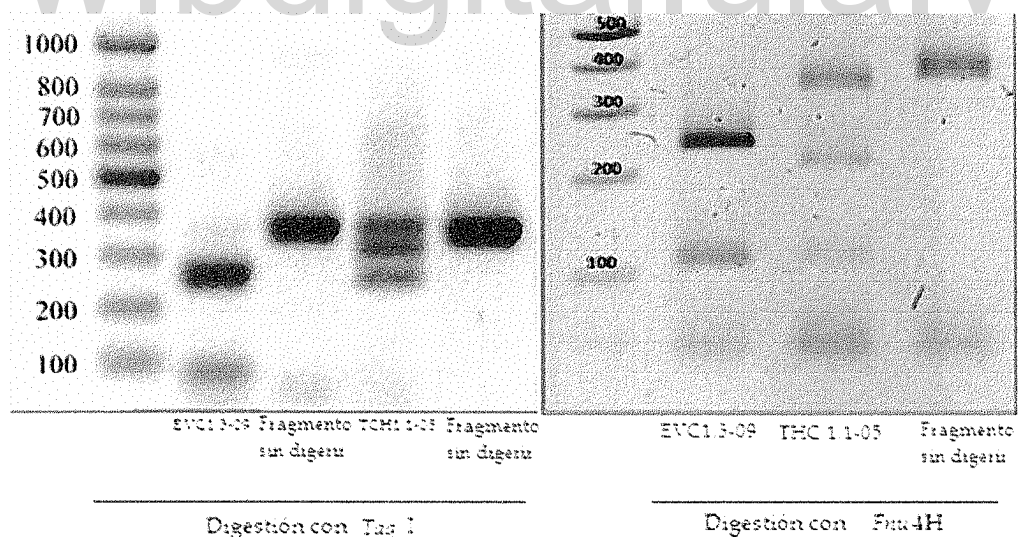


Figura 8. Productos de la digestión con *TaqI* y *Fnu4H* del amplicón locus *B1* para distintos aislados de *Phytophthora infestans* (códigos y características genéticas de los aislados en anexo 1).

II. Caracterización de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida

a) Ensayo de infección de folíolos de papa con aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de tomate del estado Mérida

Luego de 24 horas después de la inoculación, en la mayoría de los folíolos tratados se comenzó a observar pequeñas zonas de humedad y necrosis en los puntos donde se colocó el inóculo. En todos los casos la lesión observada fue aumentando gradualmente con el paso de las horas. Se encontró un porcentaje de infección del 100% para todos los aislados probados, pero se observaron diferencias importantes en cuanto al tiempo de aparición de la lesión y al tamaño de la misma entre los aislados provenientes de tomate y papa (Fig. 9 y 10). Las lesiones causadas por los aislados provenientes de tomate aparecieron aproximadamente 48 horas después que las causadas por los aislados provenientes de papa; en la Tabla 5 se muestra un promedio del diámetro de la lesión causada por los aislados en estudio, donde se observa claramente que el diámetro de la lesión causada por los aislados provenientes de papa es de mayor tamaño.

Al finalizar el ensayo se verificó la presencia de zoosporangios de *P. infestans* en las lesiones observadas bajo el microscopio realizando un montaje *in situ*, encontrando que en todas las lesiones se desarrollaron tanto el micelio, así como las estructuras reproductivas características del patógeno.

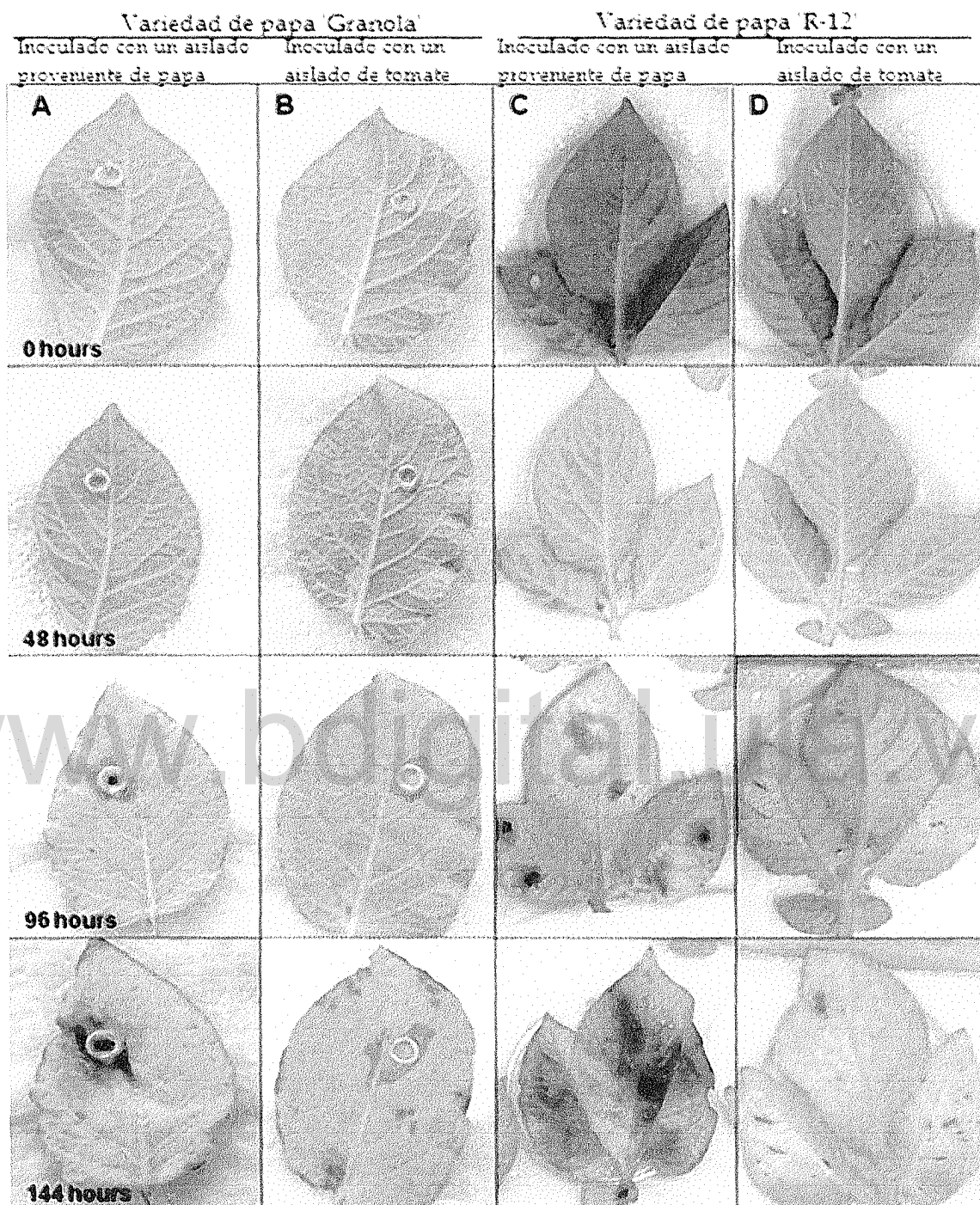


Figura 9. Ensayo de infección en folíolos de papa de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de papa y tomate.

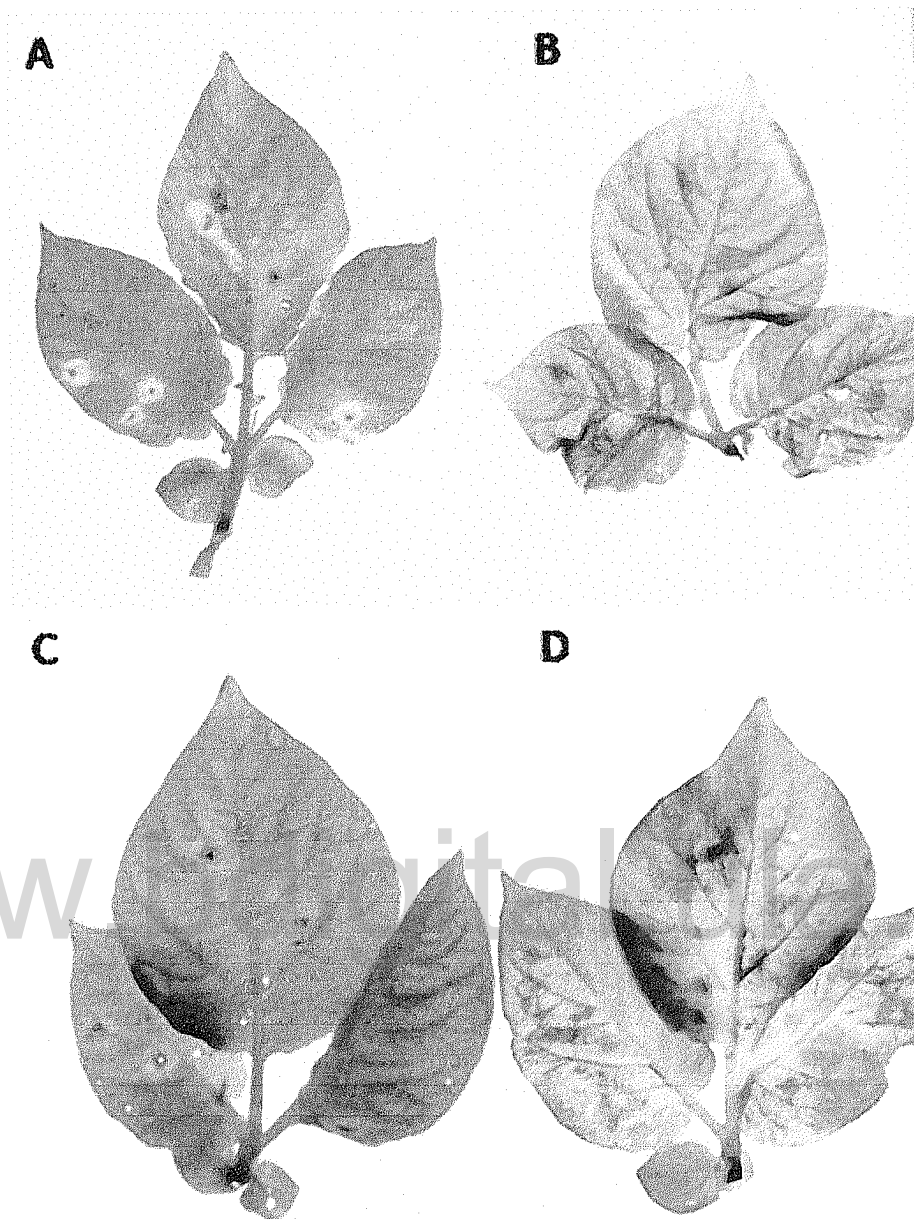


Figura 10. Ensayo de infección en folíolos de papa de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de papa y tomate. (A y C) Folíolos de papa de la variedad 'R-12' inoculados con un aislado de *P. infestans* proveniente de tomate. (B y D) Folíolos de papa de la variedad 'R-12' inoculados con un aislado de *P. infestans* proveniente de papa.

Tabla 5. Diámetro de la lesión causada por los aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de papa y tomate inoculados en folíolos de papas.

Aislados de <i>Phytophthora infestans</i>	Promedio y desviación estándar del diámetro de la lesión causada (cm)							
	72 h		96 h		120 h		144 h	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
Aislados provenientes de tomate	0.35	0.06	0.62	0.09	0.74	0.16	0.88	0.24
Aislado proveniente de papa	0.36	0.05	0.66	0.06	0.81	0.03	1.13	0.02
Control (Sin inóculo)	-		-		-		-	

b) Análisis de las secuencias de distintos genes de aislados de *Phytophthora infestans* proveniente de plantas de tomate del estado Mérida

Las condiciones usadas para la amplificación de los distintos genes dieron como resultado bandas intensas y reproducibles, adecuadas para el procedimiento de precipitación del amplicón (Fig. 11). Con el fin de enviar a secuenciar los fragmentos obtenidos en el paso anterior, se prepararon las muestras por medio de la precipitación con sales. Este procedimiento resultó efectivo, lo que permitió obtener las secuencias de los respectivos genes, las cuales se confirmaron por el programa BLAST (Zhang, et al., 2000), obteniendo en todos los casos que la especie en estudio es *P. infestans*, con un valor de similitud del 99% y 100% de cobertura, en todos los casos. Posteriormente, se procedió a la obtención de contigs por cada gen utilizando el software BioEdit, y a la realización del alineamiento entre las secuencias obtenidas y las encontradas anteriormente para los aislados de *P. infestans* provenientes de papa (Briceño et al., 2009).

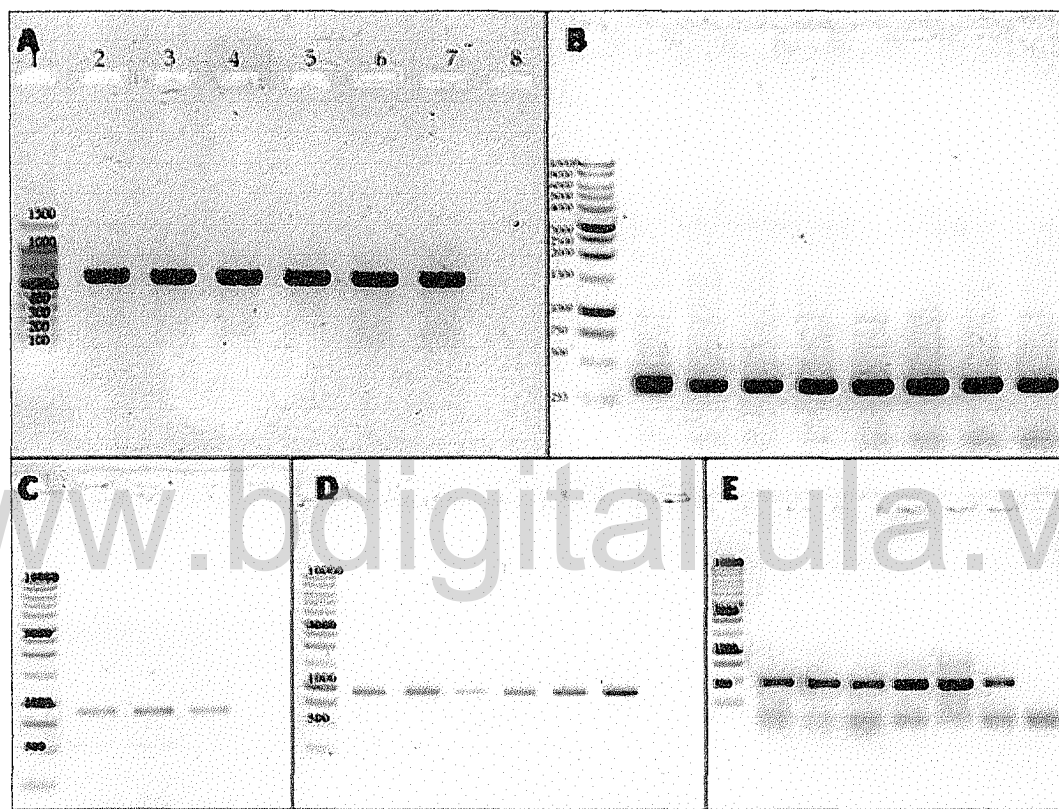


Figura 11. Producto de la amplificación de los genes en estudio para aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de folíolos de tomate, (A) *Ras*, (B) Locus *B1*, (C) *Cox1*, (D) *avr3a*, (E) *ITS*.

Se encontró para el caso de la secuencia del locus *B1*, como se explicó anteriormente, en los aislados de *P. infestans* provenientes de tomate y en algunos de los provenientes de papa, que tienen haplotipo mitocondrial IIa analizados por Briceño *et al.* (2009) y por Ruiz *et al.* (manuscrito en preparación), un indel de 25 nucleótidos. Para el caso del gen *Ras* se encontró que las secuencias del mismo en todos los casos fueron idénticas, excepto un aislado proveniente de tomate de El Vallecito, estado Mérida, el cual mostró la sustitución de dos nucleótidos en la secuencia (Fig. 12). Por otro lado, no se encontró ninguna diferencia en la secuencia de los genes *CoxI*, *Pex* e *ITS* entre los aislados provenientes de papa y tomate.

III. Estructura genética de la población de *Phytophthora infestans* en papas cultivadas en el estado Trujillo y papas nativas del estado Mérida

Determinación del tipo de talo

El tipo de talo se determinó mediante una prueba molecular que consistió en la amplificación del locus *S1*, el cual representa una región de 1.350 pb, que sólo se observa en los aislados con tipo de talo A1 (Judelson, 1996). Se obtuvieron las bandas esperadas (Fig. 13), encontrando que tanto los aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de papa del estado Trujillo como los aislados colectados en las regiones de Gavidia y Mocoa del estado Mérida, presentan un tipo de talo A1.

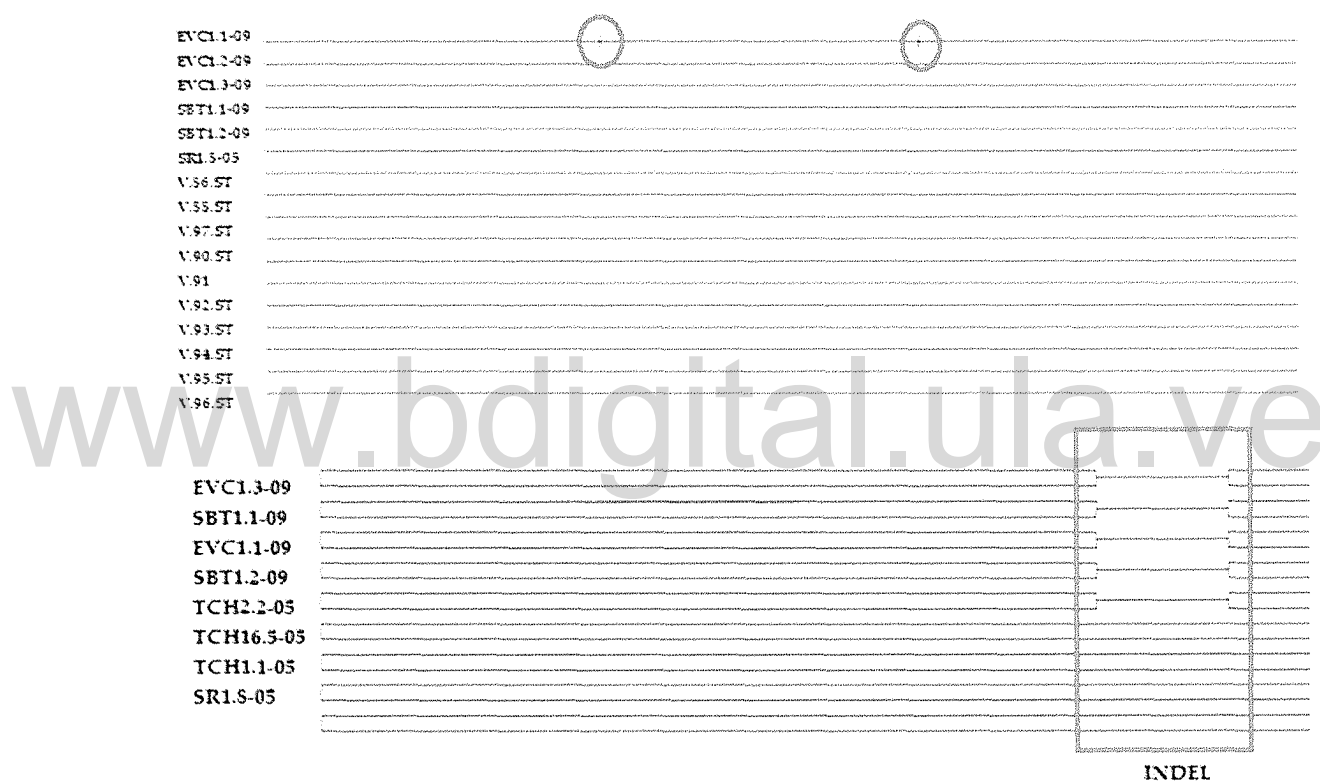


Figura 12. Alineamiento de las secuencias amplificadas de los genes *Ras* (A) y locus *B1* (B) de distintos aislados de *Phytophthora infestans* proveniente de plantas de tomate y papa de los Andes venezolanos (Identificación de los aislados en anexo 1).

Haplotipo mitocondrial

Para la determinación del haplotipo mitocondrial se procedió a la amplificación de la región P2 del genoma mitocondrial de *P. infestans* (Fig. 14) y la posterior digestión con la enzima *MspI* (Fig. 15).

El método utilizado permitió obtener los amplicones de 1.070 pb esperados para la región P2 del genoma mitocondrial de *P. infestans* de forma reproducible y con buen rendimiento. En el posterior análisis de restricción se obtuvo el patrón de bandeo esperado para el haplotipo Ia en todos los aislados de *P. infestans* incluidos en el estudio. Se utilizó como muestra control un aislado de *P. infestans* la caracterizado en estudios anteriores.

Análisis de microsatélites

Los cuatro pares de cebadores utilizados permitieron amplificar las correspondientes regiones microsatelitales de forma reproducible en todas las muestras. Se encontraron fragmentos de 156 pb para el locus *PiG11*, 159 pb para la región *Pi4G*; en el caso del fragmento *Pi4B* el amplicón fue de 218 pb, y de 130 pb para el locus *Pi2H*. De las regiones amplificadas, tres (*Pi4B*, *PiG11* y *Pi2H*) resultaron ser monomórficas para todos los aislados (Fig. 16, 17 y 19), y sólo la región *Pi4G* mostró polimorfismo (Fig. 18), al encontrar que 23,8% de las muestras provenientes del estado Trujillo presentaron un alelo distinto al resto de los aislados en estudio y a los reportados anteriormente. El análisis de los resultados permitió separar a la población proveniente de Trujillo en dos grupos, tomado en

cuenta la presencia o ausencia de los alelos encontrados. En la Tabla 6 se muestra la frecuencia de dichos alelos:

Tabla 6. Frecuencia de los alelos microsatelitales encontrados en la población estudiada de *Phytophthora infestans*.

Alelos	Frecuencia
<i>Pi2H</i>	1,000
<i>Pi4B</i>	1,000
<i>PiG11</i>	1,000
<i>Pi4GA</i>	1,000
<i>Pi4GB</i>	0,238

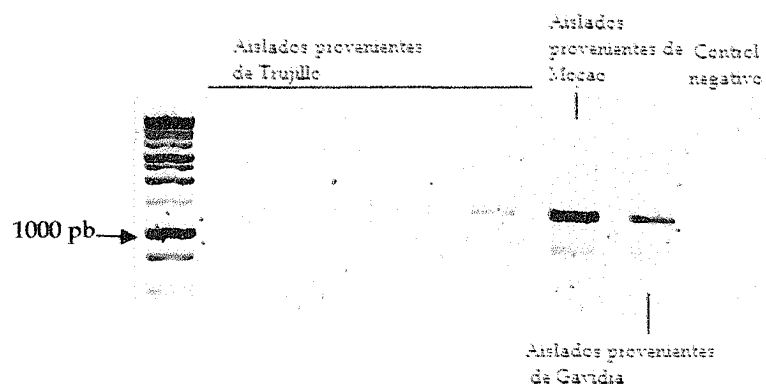


Figura 13. Electroforesis de los amplicones de la región *S1* amplificados a partir de ADN total de aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de papa del estado Trujillo y de las regiones de Gavidia y Mocao del estado Mérida (Foto representativa).

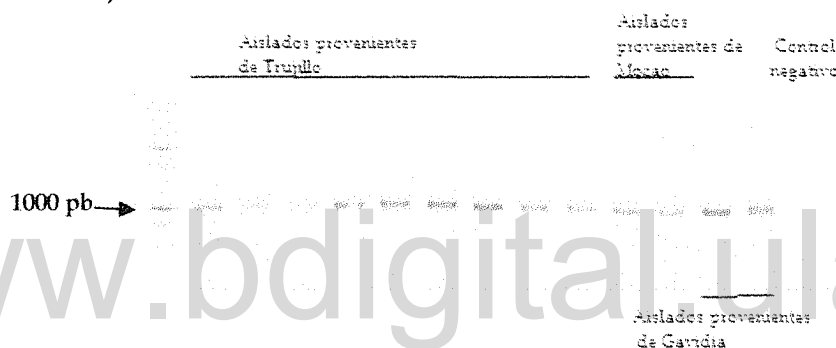


Figura 14. Electroforesis de los amplicones de la región *P2* del genoma mitocondrial de *Phytophthora infestans* de aislados provenientes de plantas de papa del estado Trujillo y de las regiones de Gavidia y Mocao del estado Mérida (Foto representativa).

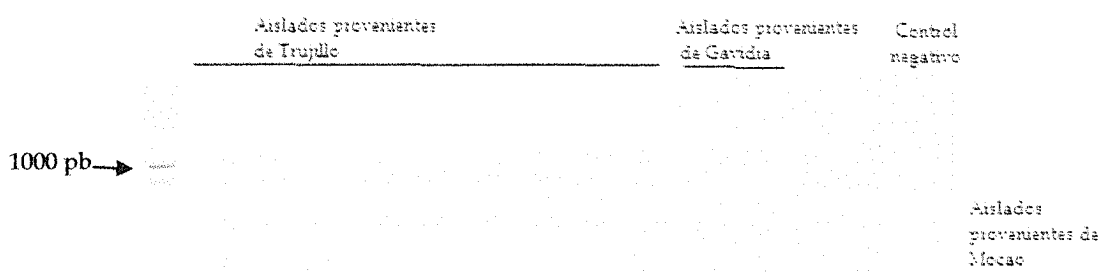


Figura 15. Electroforesis de la digestión con *MspI* de los amplicones de la región *P2* del genoma mitocondrial de *Phytophthora infestans* de aislados provenientes de plantas de papa del estado Trujillo y de las regiones de Gavidia y Mocao del estado Mérida (Foto representativa).

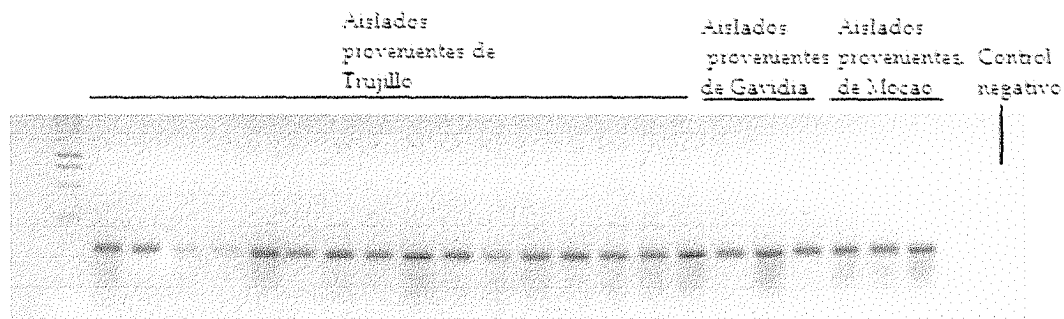


Figura 16. Patrones de amplificación del locus *Pi2H* (Foto representativa).

www.bdigital.ula.ve

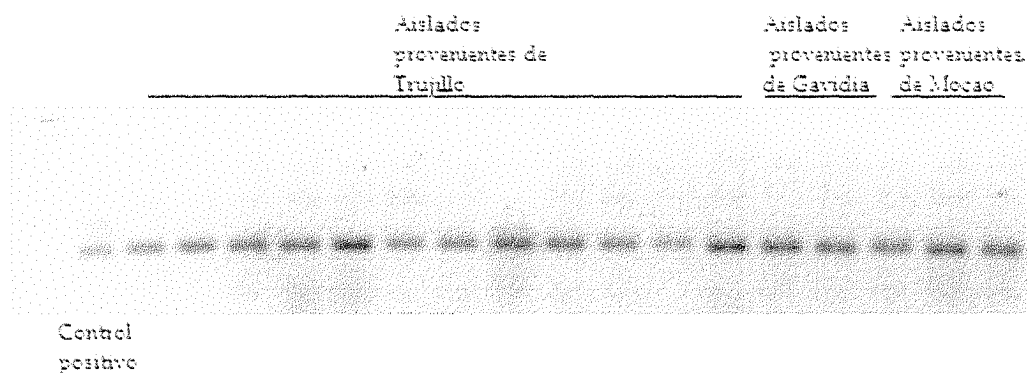


Figura 17. Patrones de amplificación del locus *PiG11* (Foto representativa).

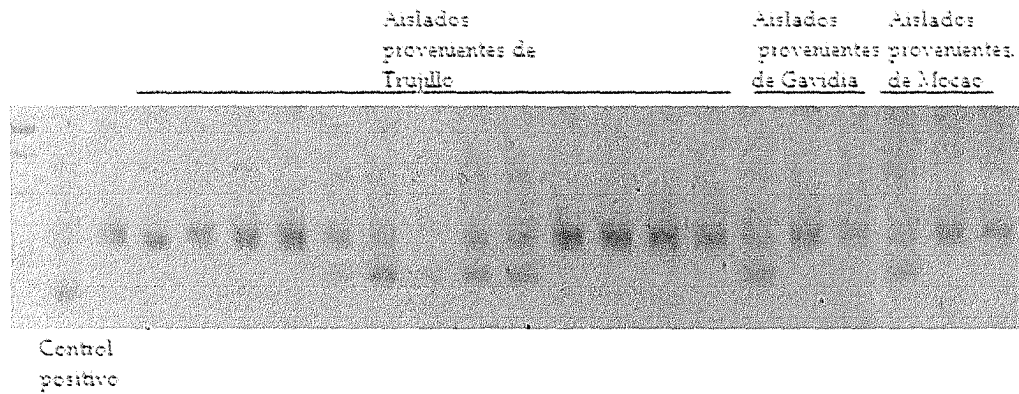


Figura 18. Patrones de amplificación del locus *Pi4G* (Foto representativa).

www.bdigital.ula.ve

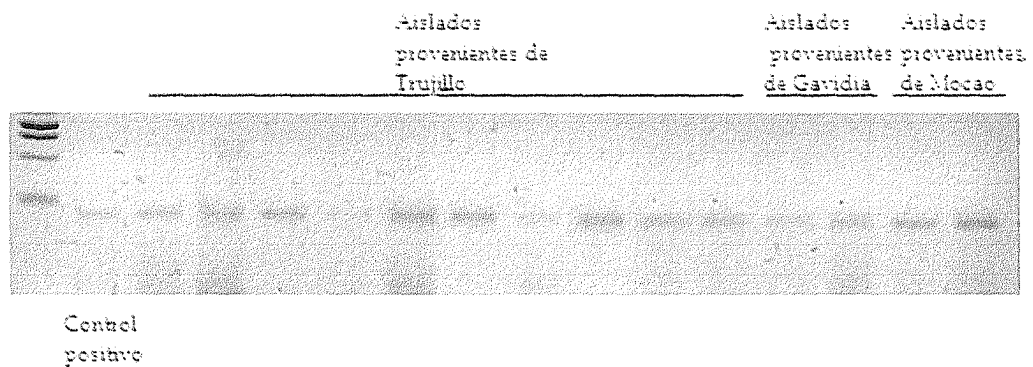


Figura 19. Patrones de amplificación del locus *Pi4B* (Foto representativa).

En cuanto a los aislados provenientes de papas nativas encontradas en Gavidia y Mocoa, estado Mérida, no se observaron diferencias con respecto a los reportados para el resto de los Andes venezolanos, ni a los controles provenientes de papas de cultivo reportadas anteriormente.

IV. Marcador candidato: estudio del gen de la enzima manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*

La clonación del gen codificante de la enzima manitol deshidrogenasa de *P. infestans* resultó exitosa, permitiendo así la decucción de la secuencia de la enzima en estudio y concretar los primeros pasos para su expresión y posterior caracterización.

Se identificó una alcohol deshidrogenasa putativa en el genoma de *P. infestans*, y a partir de la secuencia reportada en el NCBI (número de acceso XM_002902066) la Licda. Yarúa Jaimes y el Dr. Gustavo Fermin diseñaron iniciadores específicos que en este trabajo permitieron la amplificación exitosa de dos regiones: una región de aproximadamente 1300 pb que corresponde a la secuencia codificante de la enzima manitol deshidrogenasa, y otra de aproximadamente 250 pb, la cual suponemos corresponde a una amplificación inespecífica (Fig. 20). Por este motivo se hizo necesario la recuperación de la banda de interés por medio de la purificación a partir del gel de electroforesis utilizando el kit Gel/PCR purification de FAVORGEN (Cat. FAGCK001).

Luego de la amplificación y purificación de la banda se procedió al proceso de clonación en el sistema pGEM-T Easy en células de *E. coli* XL1-blue, para posteriormente sub-clonarlo en el vector de expresión pET28a y transformar células de *E. coli* BL21(DE3). La presencia y sentido del gen clonado se confirmó con la amplificación mediante PCR de colonia, PCR convencional, luego de la extracción del ADN plasmídico, y restricción con enzimas específicas (Fig. 21). El método utilizado en cada paso resultó satisfactorio, permitiendo obtener células competentes con un alto rendimiento, la amplificación exitosa del gen clonado con ambos métodos de PCR y la verificación del sentido de la secuencia dentro del vector de expresión.

Se dio inicio a los ensayos de expresión para la obtención de la enzima en estudio en el sistema heterólogo seleccionado, sin ningún éxito. El método de expresión seleccionado consistió en la inducción con IPTG y visualización de proteínas totales en geles de poliacrilamida donde no se observó ningún indicio de la sobreexpresión de la enzima en estudio (Fig. 22). La verificación de la actividad enzimática en geles nativos de poliacrilamida tampoco resultó exitosa: inicialmente la eficiencia del método de ruptura celular seleccionado se estandarizó evaluando la actividad enzimática de la fosfoglucosa isomerasa (PGI) (Fig. 23), y posteriormente se probó el procedimiento para la manitol deshidrogenasa sin encontrar ninguna evidencia de actividad enzimática.

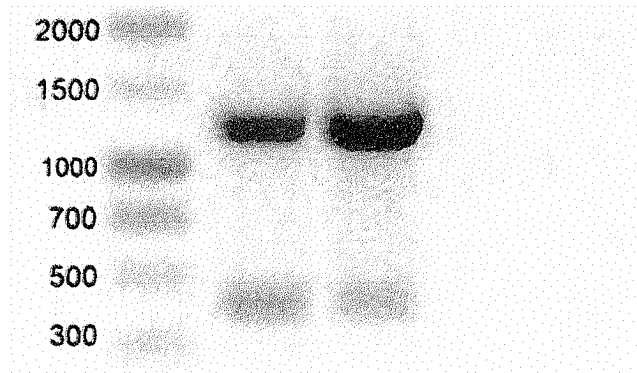


Figura 20. Amplificación por PCR del gen codificante de la enzima manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*.

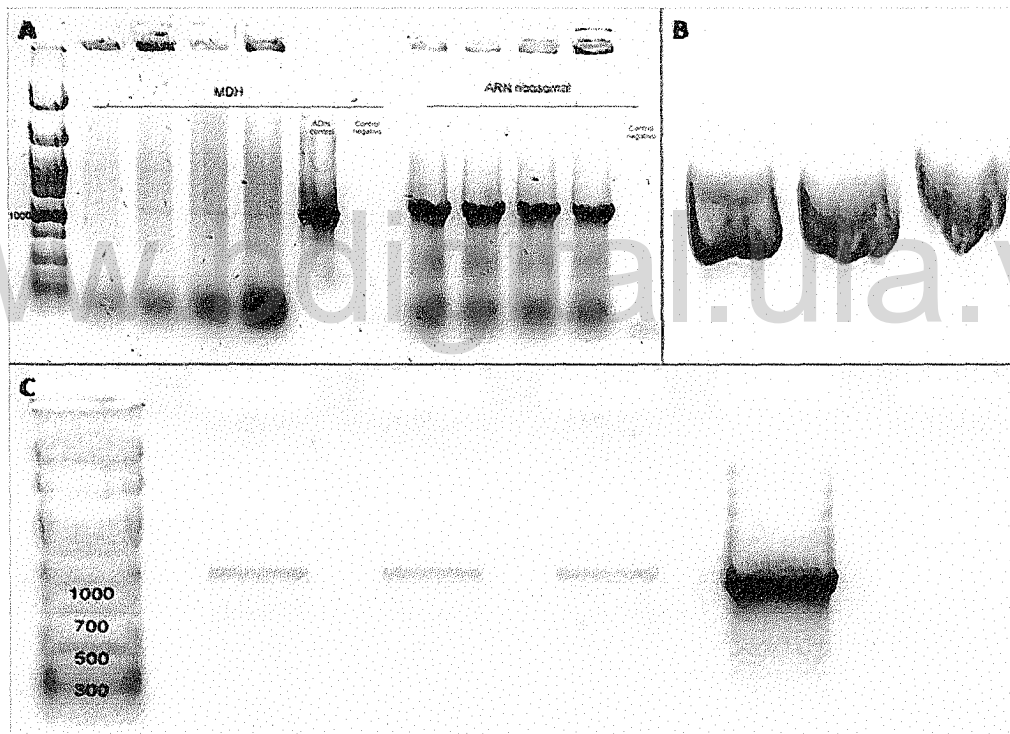


Figura 21. Evidencias de la clonación eficiente de la enzima manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*. **A** PCR de colonia, **B** extracción de ADN plasmídico, **C** amplificación convencional del gen codificante de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans* a partir de un vector de expresión pET28a.

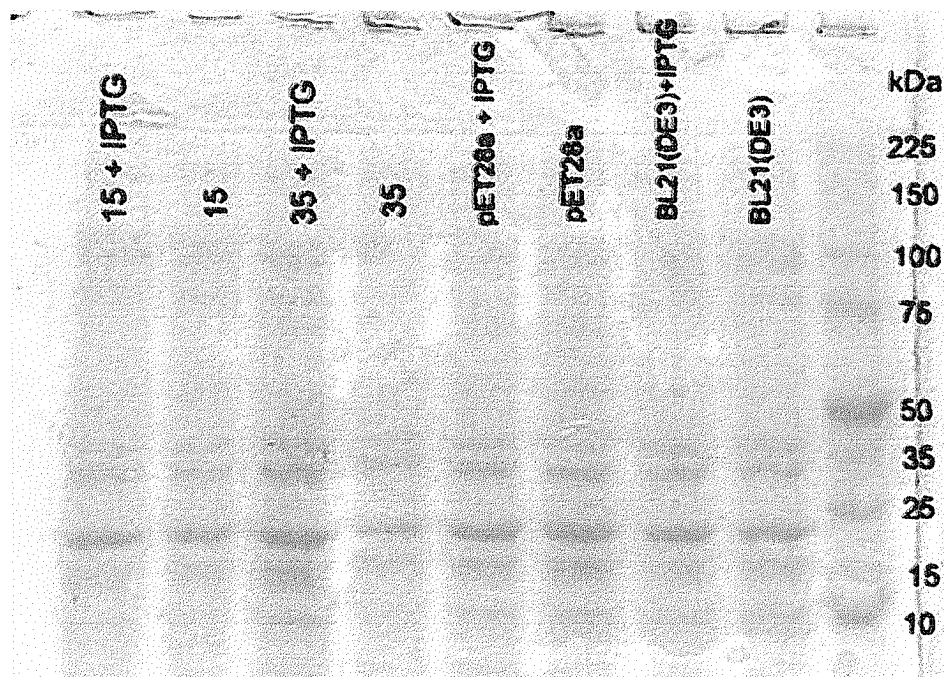


Figura 22. Extractos de proteínas totales del ensayo de expresión de la manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans* en poliacrilamida al 8% (códigos de las cepas anexo 3).

Escherichia coli
BL21(DEE3)

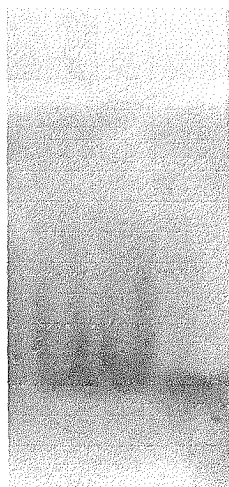


Figura 23. Actividad en geles nativos de la fosfoglucoasa isomerasa (PGI) de *Escherichia coli*.

La secuencia del gen codificante de la enzima manitol deshidrogenasa de *P. infestans* se obtuvo de forma exitosa y a partir de esta se realizaron los análisis de secuencias pertinentes. La secuencia obtenida inicialmente tenía una longitud de 1420 pb que luego de la edición, en la cual se eliminaron los restos de las secuencias del vector, mostró 1245 pb. Inicialmente, esta secuencia fue analizada usando el Conserved Domain Database (CDD) del NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2009), donde se encontró que codifica para el multidominio de las alcohol deshidrogenasas dependientes de Zn, agrupándose en la superfamilia MDR, que contiene a este tipo de enzimas (ADH - Zn) y proteínas relacionadas. Posteriormente, se localizaron los marcos abiertos de lectura de la secuencia utilizando el ORF finder del NCBI desarrollado por Tatusov, T. y Tatusov, R. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), donde se reportó un marco abierto de lectura de 1056 pb que codifica para un polipéptido de 351 aminoácidos, 99% idéntico a la alcohol deshidrogenasa reportada anteriormente para *P. infestans*.

Adicionalmente, se realizó un análisis de la secuencia con el software SignalP 4.1 del servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> (Bendtsen *et al.* 2004), el cual encontró un péptido señal (aminoácido de 1-34) con un posible sitio de corte en el aminoácido número 34-35, con una puntuación de discriminación de 0,497.

El análisis *in silico* de la secuencia del polipéptido predice una proteína madura con un peso molecular de 37,69 KDa, punto isoelectrico de 8,27 y promedio de hidrofobicidad de -0,154.

Posteriormente, se realizó una búsqueda de secuencias de proteínas manitol (alcohol) deshidrogenasa con este dominio en diferentes grupos de organismos utilizando la base de datos del NCBI. En la Fig. 24 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína en estudio reportada para *P. sojae*, *P. parasítica* y la secuencia encontrada en este trabajo, donde se observa un alto grado de similitud entre ellas. Este alineamiento se realizó con el uso de los software Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) y GeneDoc (Nicholas y Nicholas, 1997). Adicionalmente, estas secuencias y las reportadas en el GenBank, para otros grupos de organismos, fueron alineadas y sirvieron para la creación de un árbol filogenético en el software Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), utilizando el test del vecino más cercano y el método filogenético de bootstrap con 500 replicas, el cual se muestra en la Fig. 25.

Por otro lado, utilizando la herramienta del ExPASy: Swiss Model (Arnold *et al.*, 2006), PSIPRED (ExPASy), el I-TASSER del Zhang Lab de la Universidad de Michigan (Zhang *et al.*, 2008) y PyMOL version 1.5.0.4 (Schrödinger, LLC.) se logró predecir el modelo tridimensional del monómero de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans* (Fig. 26).

En la Fig. 27 se puede observar la predicción de la estructura terciaria de la proteína, la cual está compuesta por 7 α -hélices y 13 láminas- β . También, se predicen tres sitios de unión a ligandos, uno para Nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD), otro para el ion Zinc y el último para el trifluoroetanol.

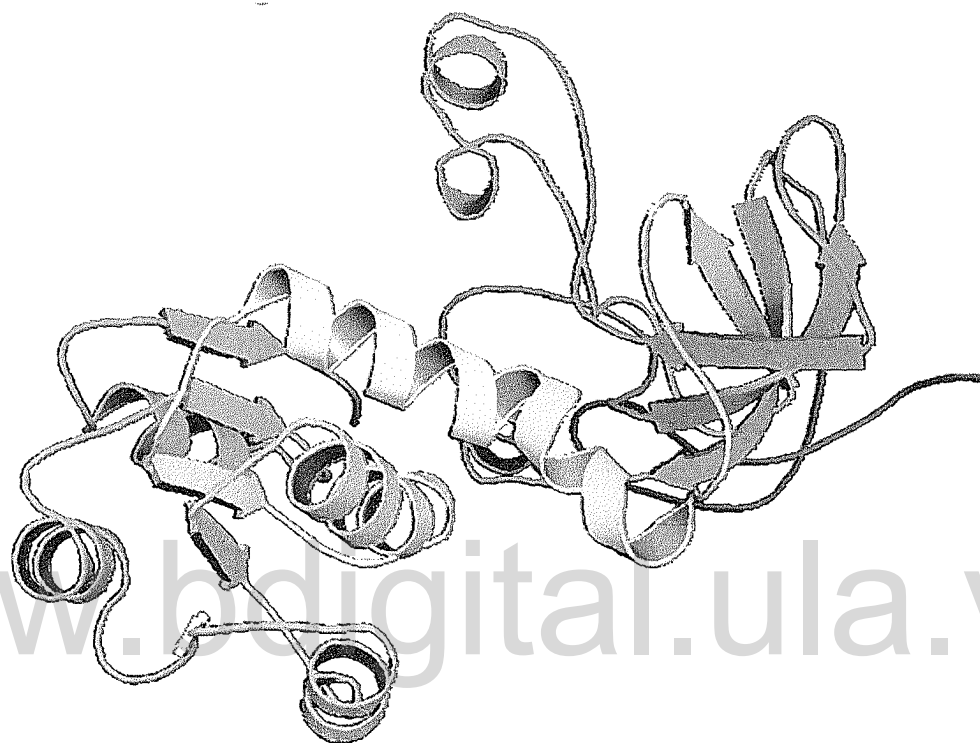


Figura 26. Modelo tridimensional predicho para el monómero de la manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*.

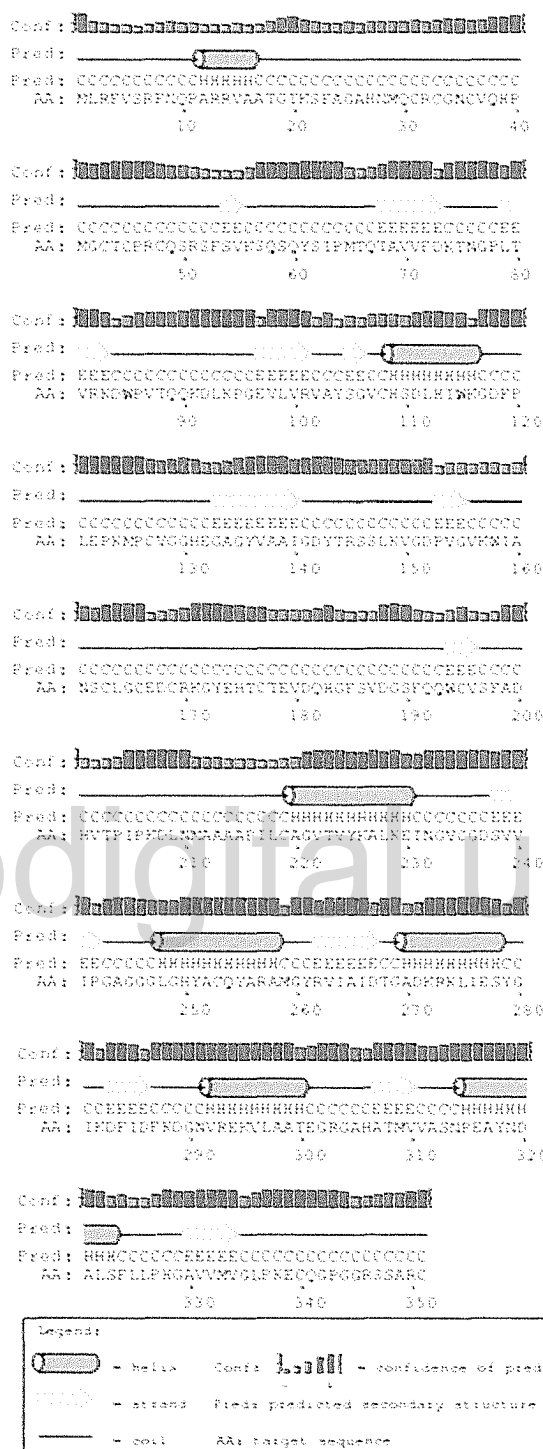


Figura 27. Análisis de la estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos de la manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*.

V. Comparación molecular entre aislados de *Phytophthora infestans* y *Pythium insidiosum*

Amplificación por PCR y análisis del locus B1

Se verificó la integridad y concentración del ADN de los aislados de *Pythium insidiosum* en estudio por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, donde no se observó la cantidad esperada de las muestras. En sólo dos de las siete muestras (código de las muestras en anexo 2) recibidas se observó una muy tenue banda; sin embargo, se probó la amplificación de ciertos genes con los cebadores indicados anteriormente.

De los cebadores utilizados para caracterizar previamente a *P. infestans*, en *P. insidiosum* sólo se obtuvo amplificación para el caso de ITS4 y el locus B1 (Fig. 28), encontrando una banda de la misma longitud que la amplificada a partir del ADN de *P. infestans*. Con el resto de los iniciadores analizados (Tabla 4), no se obtuvo ningún amplicón, con excepción de los utilizados para la amplificación de la manitol deshidrogenasa, con los cuales se obtuvo una banda de aproximadamente 300 pb, correspondiente a una de las dos bandas encontradas en la amplificación a partir de *P. infestans* (Fig. 28), la cual se cree amplifica un producto inespecífico que no corresponde con la enzima en estudio, como se mencionó anteriormente.

El amplicón obtenido del locus B1 se sometió a digestión con la enzima *Fnu4HI* obteniendo un patrón que corresponde con las muestras de *P. infestans* que presentan la inserción (Fig. 29).

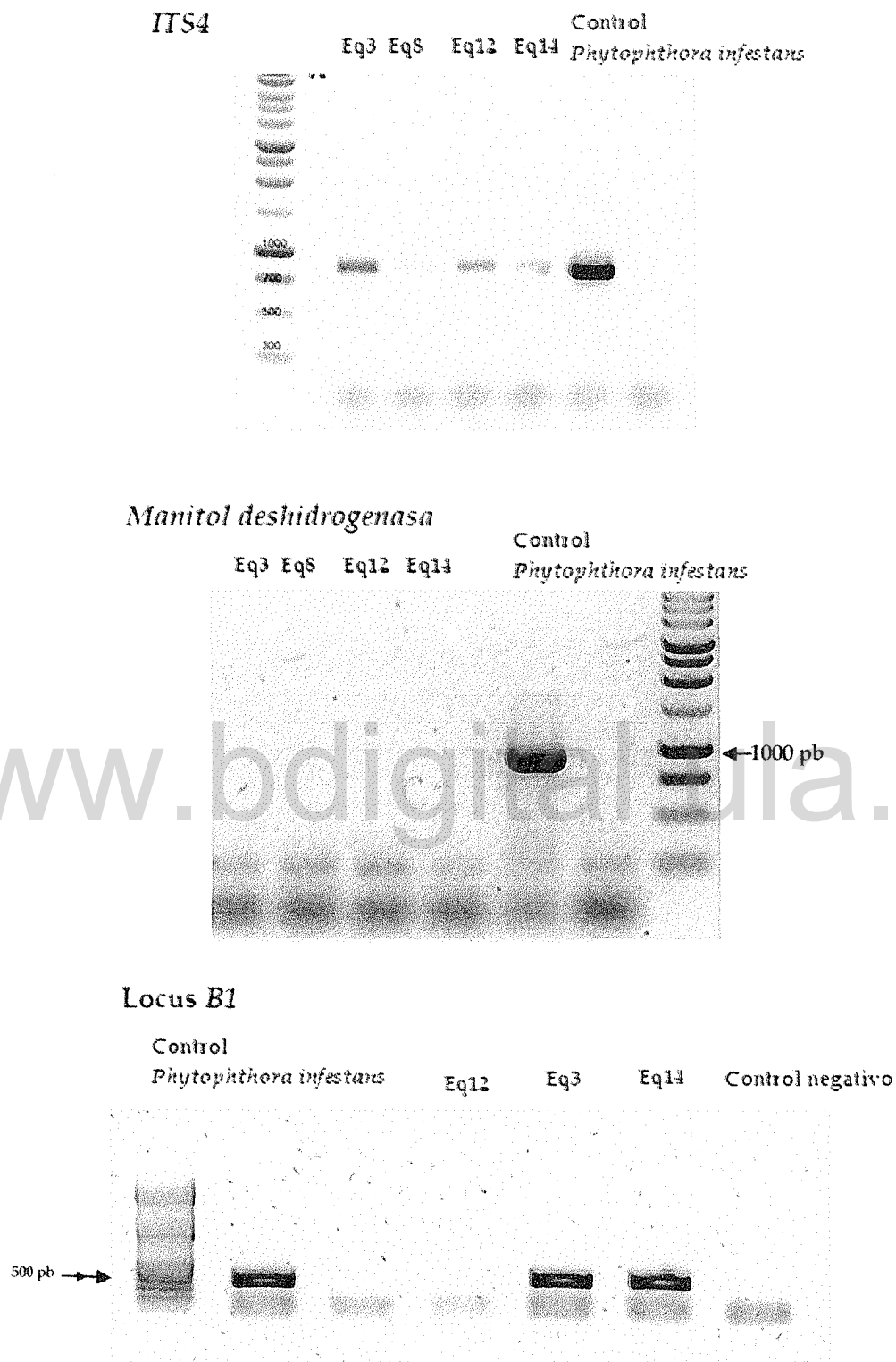


Figura 28. Amplificación por PCR de las regiones génicas de *ITS4*, manitol deshidrogenasa y locus *B1*.

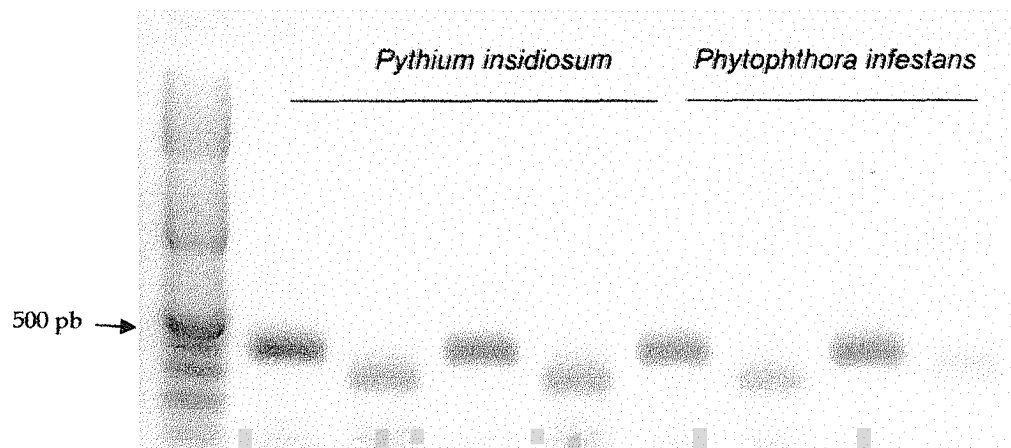


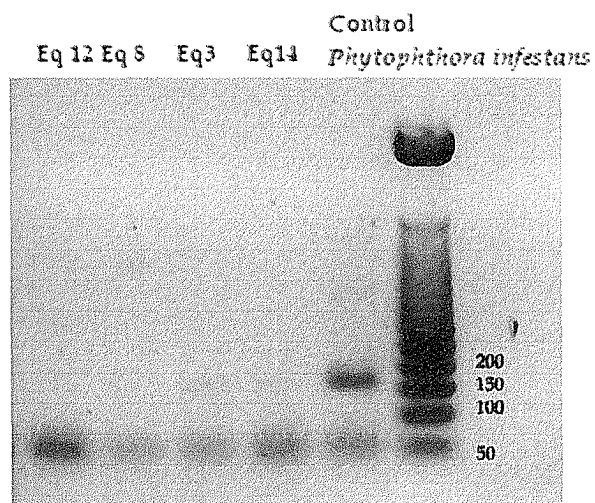
Figura 29. Digestión del amplicón con *Fnu4HI* del locus *B1* de *Pythium insidiosum* (foto representativa).

Caracterización mediante el uso de microsatélites

De los cebadores para microsatélites probados en esta especie, con sólo dos de ellos se obtuvo amplificación, *Pi2H* y *Pi4G* (Fig. 30). En ambos casos los productos de amplificación resultaron muy tenues, y a pesar de los intentos por mejorar el rendimiento de la reacción (modificación de temperaturas de anillamiento, aumento en el número de ciclos de incubación y aumento en la cantidad de $MgCl_2$), no se obtuvieron mejores resultados.

Para el caso del locus *Pi2H*, el cual resultó ser monomórfico en el caso del análisis de población de *P. infestans*, se observaron bandas idénticas a las obtenidas a partir del ADN de *P. infestans*. Igualmente, en el caso del locus *Pi4G*, el cual sí presenta polimorfismos en el análisis de población de *P. infestans*, se encontró una banda idéntica a la amplificada para aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de papa de Mérida, Trujillo y Táchira que presentan un haplotipo mitocondrial Ia.

Pi2H



Pi4G

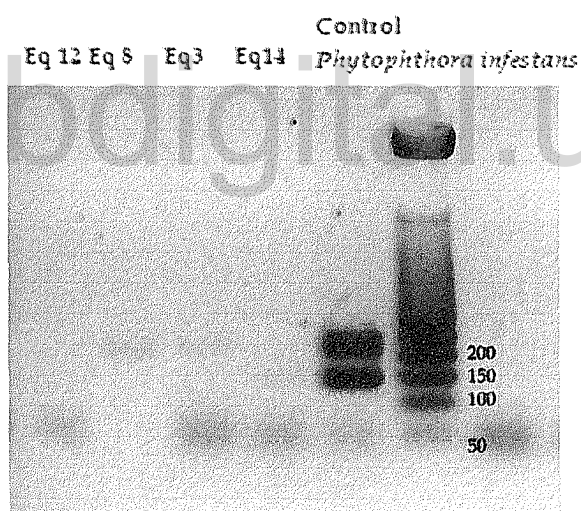


Figura 30. Electroforesis de la amplificación del locus *Pi2H* (A) y *Pi4G* (B) en *Pythium insidiosum*.

DISCUSIÓN

Dentro de los Stramenopiles (reino Chromalveolata) se han clasificado numerosas especies patógenas de distintos organismos como *Blastocystis hominis* (patógeno de distintos grupos animales incluyendo humanos), los organismos de los géneros *Saprolegnia* y *Aphanomyces*, pertenecientes al orden Saprolegniales, que infectan peces y crustáceos, y los conocidos fitopatógenos miembros de los órdenes Pythiales y Peronosporales; estos tres últimos órdenes reconocidos como Oomycetes.

Dentro de los oomycetes se encuentra clasificado un organismo capaz de causar graves infecciones en mamíferos; esta especie es *Pythium insidiosum*, única desde el punto de vista ecológico y fisiológico, ya que en contraste con otras especies del género, desarrolló la capacidad de causar patologías en animales, incluso humanos. En este trabajo se propuso como objetivo plantear métodos para el estudio del patosistema *Pythium insidiosum*-mamífero, al comparar este organismo con su pariente fitopatógeno *Phytophthora infestans* y contribuir al análisis hecho hasta el momento en la población de esta especie en los estados andinos de Venezuela.

Inicialmente, se analizó el locus B1 descrito por Judelson (1996), en la población de *P. infestans* previamente caracterizada, encontrándose resultados importantes para proponer esta región nuclear como marcador molecular en

estudios epidemiológicos, ya que muestra diferencias entre los miembros de la población que permiten robustecer los estudios en cuanto a variabilidad genética del patógeno.

Con el fin de determinar las bases genéticas del tipo de talo presente en aislados de *P. infestans*, Judelson *et al.* (1995) realizan estudios de mapeo genético y segregación de loci relacionados con este carácter, encontrando trece loci vinculados al tipo de talo A1 y A2, todos mapeados en una simple región, de segregación no mendeliana, que determina ambos tipos de talo. Posteriormente, Judelson (1996) publica un artículo donde analiza la variación física y genética de los loci encontrados en su trabajo anterior. Describe el locus *S1* que consiste en una región de 1350 pb, compuesta de repeticiones en tándem presente en un estado hemigigótico sólo en el tipo de talo A1. También fueron descritos otros loci como *A13*, *B1*, *X1*, *W16* y *U5*, los cuales se mostraron inapropiados para estudios de segregación ya que sus secuencias son propensas a deleciones, duplicaciones o transposiciones, trayendo como consecuencia polimorfismos no relacionados con el tipo de talo. Uno de estos loci polimórficos, el denominado *B1*, fue el estudiado en este trabajo, inicialmente analizando la secuencia de pares de bases reportadas por primera vez aquí, ya que al realizar el análisis Blast no se obtiene ningún resultado, a pesar de que el genoma de *P. infestans* se encuentra secuenciado en su totalidad, y posteriormente desarrollando una prueba sencilla basada en la restricción con enzimas específicas. Los resultados fueron satisfactorios

permitiendo ver diferencias en la población estudiada, logrando encontrar dos grandes grupos de acuerdo al indel observado en este locus.

Los polimorfismos encontrados al analizar el locus *B1* coinciden con los resultados encontrados para otros marcadores moleculares utilizados en los estudios de variabilidad genética realizados con poblaciones del patógeno de Los Andes venezolanos. Como se explicó en la sección de resultados, tomando para fines del análisis las diferencias encontradas como una inserción, los aislados que la presentan son aquellos provenientes de papa del estado Mérida, Trujillo y la mayor parte de los del estado Táchira, que también presentan un haplotipo mitocondrial Ia. Por otra parte, los aislados provenientes de papa que presentan un haplotipo mitocondrial IIa, encontrados en el estado Táchira, así como los aislados de tomate, no presentan la inserción, resultado que también coincide con uno de los microsatélites estudiados por Briceño *et al.* (2009) y Ruiz *et al.* (manuscrito en preparación), logrando, con el estudio del locus *B1*, robustecer el análisis poblacional de *P. infestans* en Los Andes.

En dicho análisis se caracterizó la población y se logró separarla en distintos grupos, como se muestra en el dendograma de la Fig. 31, el cual se obtuvo del análisis de microsatélites realizado para los aislados de *P. infestans* provenientes de Los Andes venezolanos, donde se pueden distinguir cuatro grupos (Ruiz *et al.*, manuscrito en preparación). La primera ramificación del árbol coincide con los SRR *PiG11* y *Pi4G*, además de la planta hospedadora a partir de la cual se aisló al organismo, y la ramificación encontrada en el grupo de los aislados provenientes

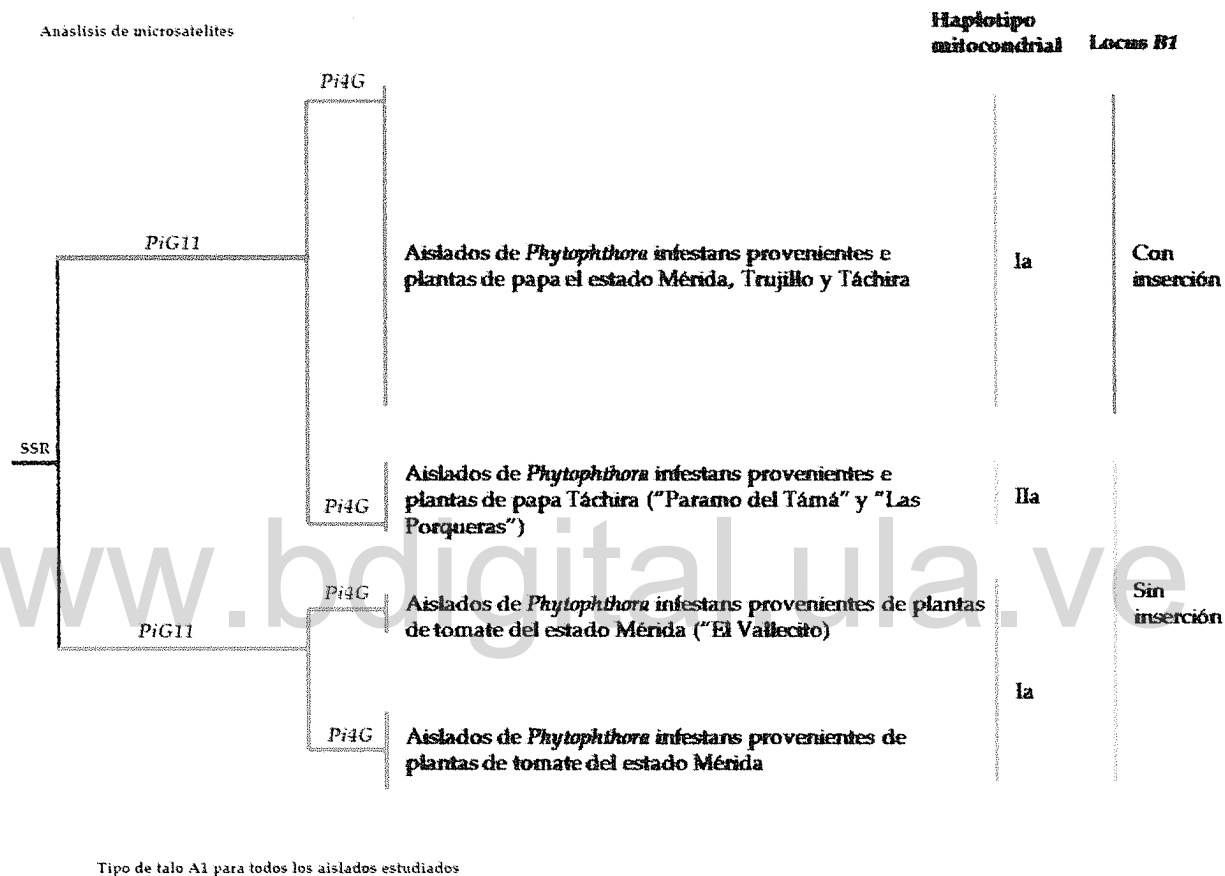


Figura 31. Dendrograma del análisis de la variabilidad de las secuencias de microsatélites de la población de *Phytophthora infestans* estudiada en los estados andinos de Venezuela, donde se incluyen los resultados encontrados para el haplotipo mitocondrial y el análisis del locus B1.

de papa coincide a su vez con el haplotipo mitocondrial encontrado. En la Fig. 31 se incluye el resultado del análisis del locus *B1*, y al ver la coincidencia con el marcador molecular SSR *Pi4G* utilizado podemos afirmar la eficiencia de éste para determinar diferencias entre distintas poblaciones de aislados de *P. infestans*.

Por otro lado, luego del muestreo y caracterización de los aislados de *P. infestans* encontrados en hospedadores distintos a papa en el estado Mérida, realizado como trabajo especial de grado para optar por la licenciatura en biología (Ruiz *et al.*, manuscrito en preparación), donde se encontró infección por *P. infestans* sólo en plantas de tomate, y cuyos aislados presentaron diferencias fisiológicas y en la composición alélica estudiada por SSR, indicando que potencialmente son distintos a los aislados provenientes de papa (Tabla 7), se hizo necesario completar esta información con ensayos adicionales que se presentan en este trabajo.

Inicialmente, se verificó la capacidad de infectar folíolos de papa de estos aislados, encontrándose un resultado positivo en las dos variedades de papas estudiadas, pero se observaron ciertas diferencias en comparación con los aislados provenientes de papa que se utilizaron como grupo control. Inicialmente, las lesiones causadas por los aislados de plantas de tomate aparecen varias horas después que la lesión causada por los aislados control, y además, el diámetro de la lesión es considerablemente más pequeño. Estos resultados coinciden con los esperados ya que estos aislados se reportaron con ciertas diferencias fisiológicas y culturales comparándolos con los aislados provenientes de papa (Ruiz *et al.*,

manuscrito en preparación). Por ejemplo, el tiempo que toma el micelio para crecer en el medio de cultivo, y formar zoosporas y oosporas en el caso de los aislados provenientes de tomate, es el doble que para el caso de los aislados de papa que pueden demorar alrededor de 15 días. Además, los aislados de tomate sólo pueden crecer en medio de cultivo elaborado a partir de guisantes frescos, mientras que el resto de los aislados crecen en medio de harina de avena, garbanzos y habas (Tabla 7). Estas observaciones apuntan a que el origen de estos aislados encontrados en plantas de tomate no provienen de plantas de papa, ya que al compararse con estos tienen ciertas desventajas a la hora de causar la infección. Adicionalmente, las diferencias genéticas que fueron encontradas son evidencia de la especificidad de hospedador de estos aislados, y nos lleva a preguntarnos si existen otros hospedadores de este patógeno.

En cuanto al análisis de secuencias, no se observaron diferencias entre aislados de *P. infestans* provenientes de papa y los de tomate, en la mayoría de los genes estudiados, sólo aparecieron en la secuencia del gen *Ras* para un aislado proveniente de tomate de “El Vallecito”, estado Mérida, el cual, vale la pena resaltar, proviene de un cultivo de semillas híbridas importadas de forma ilegal desde Canadá. También, se encontraron diferencias para el caso del locus *B1*, permitiendo distinguirlos de la población de aislados provenientes de papa que presentan un haplotipo mitocondrial Ia y cierto patrón al analizar el SSR *Pi4G*. Es importante aclarar que en el trabajo anterior (Ruiz *et al.*, manuscrito en preparación) estos aislados provenientes de tomate también presentaron

diferencias en la composición alélica en dos de las regiones microsatelitales estudiadas, encontrando una población más diversa genéticamente que coinciden con las diferencias fisiológicas (Tabla 7).

Tabla 7. Diferencias fisiológicas y moleculares entre aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de plantas de papa y tomate.

Variables estudiadas	Aislados provenientes de papa	Aislados provenientes de Tomate
Tiempo que toma el micelio para crecer en el medio de cultivo	Aproximadamente 10 días	Aproximadamente 20 días
Comportamiento frente a los distintos medios de cultivo	Crece en medio de avena, guisante con ergosterol, garbanzo y habas separadamente	Sólo crece en medio de guisantes con ergosterol
Tiempo que toma para la formación de zoosporangio y oosporas	La formación de zoosporas se observa luego de aproximadamente 12 días desde su siembra. La formación de oosporas se observa luego de tres semanas desde el apareamiento	La formación de zoosporas se observa luego de aproximadamente 30 días desde su siembra. La formación de oosporas se observan luego de seis semanas desde el apareamiento
Temperatura en la cual se observa un óptimo crecimiento	18°C	Temperatura ambiente >18°C
Haplotipo mitocondrial	Ia y IIa	Ia
Secuencia del intrón <i>Ras</i>	Idéntica en todos los casos	Se encontró un aislado que presentó la sustitución de dos nucleótidos en la secuencia
Variabilidad del locus <i>PiG11</i>	Monomórfico entre ellos. Distinto a los encontrados en aislados de tomate	Monomórfico entre ellos. Distinto a los encontrados en aislados de papa
Variabilidad del locus <i>Pi4G</i>	Polimórfico entre ellos. Distinto a los encontrados en aislados de tomate	Polimórfico entre ellos. Distinto a los encontrados en aislados de papa
Variabilidad del locus <i>Pi4B</i> y <i>Pi2H</i>	Monomórfico en ambos hospedadores	

En varias regiones a nivel mundial se han reportado un gran número de Solanáceas infectadas por *P. infestans*. En Europa, por ejemplo, se han observado que las poblaciones de *P. infestans*, con distintos haplotipos, se caracterizan en general, pero no exclusivamente, por poseer un hospedador específico (Knapova y Gisi, 2002). En el caso de Latinoamérica, también se han observado estas diferencias entre aislados provenientes de distintos hospedadores. En Colombia, por ejemplo, el primer reporte del tipo de talo A2 proviene de un aislado de *P. infestans* encontrado en Uchuva (*Physalis peruviana*) (Vargas et al., 2009).

En Los Andes venezolanos no se encontraron diferencias en cuanto a haplotipo mitocondrial y tipo de talo, pero tomando en cuenta los hallazgos en el estudio de microsatélites, diferencias en las secuencias del locus *B1* y la fisiología de los aislados antes mencionadas de la población de *P. infestans* encontrada en plantas de tomate del estado Mérida y al compararlas con las características de los aislados provenientes de papa, es evidente que en nuestro país también existen diferencias dependiendo de la planta hospedadora.

Para abordar de forma exitosa el estudio de un patosistema, con miras a resolver el problema observado por causa de la enfermedad, es necesario conocer a la población del patógeno y del hospedador de forma independiente. Con este fin en este trabajo se logró incrementar el conocimiento de la población venezolana de *P. infestans*, caracterizando a la población encontrada en plantas de papa de cultivo del estado Trujillo y en plantas de papas nativas del estado Mérida.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos confirman la premisa planteada inicialmente donde se presumía que la población de *P. infestans* aislada de plantas de papas nativas de los sectores de Gavidia y Mocoa del estado Mérida es idéntica a las reportadas para el resto de los Andes venezolanos, ya que dentro de esta población no se encontró ninguna diferencia en los caracteres estudiados. Por otro lado, se encontraron individuos provenientes del estado Trujillo que poseen una estructura genética distinta a la encontrada en el resto de las zonas estudiadas del país.

La población de *P. infestans* ensayada, donde se analizaron 40 aislados procedentes del estado Trujillo y 6 de las regiones Gavidia y Mocoa del estado Mérida, muestran la presencia exclusiva del tipo de talo A1, y con respecto al haplotipo mitocondrial solo se encontró del tipo Ia, idéntico a lo reportado en el resto del estado Mérida y la mayor parte del estado Táchira. Los aislados que presentaron el haplotipo IIa en Venezuela provienen de Las Porquerías y de la zona fronteriza entre Venezuela y Colombia (Páramo de El Tamá); además, estos mismos aislados presentaron una composición alélica, determinada por microsatélites, distintas al resto de la población estudiada, permitiendo separarla en dos grupos bien definidos, tomando en cuenta ambas características. En la población de Trujillo se encontró un alelo, determinado por el análisis de regiones microsatélites, distinto a los encontrados hasta el momento en la población de Los Andes venezolanos, permitiendo separarlos en un grupo distinto.

Cárdenas *et al.* (2011), publican un trabajo donde se hace el análisis de cuatro regiones nucleares (*ITS*, *Ras*, β -*tubulina* y *Avr3a*) y una mitocondrial (*Cox1*) de los aislados de *P. infestans* encontrados en diferentes hospedadores del norte de Los Andes, específicamente en Colombia y Venezuela, hallando una baja diversidad genética, que revela una población clonal del patógeno en esta región, lo cual coincide con lo reportado previamente en otros países de Suramérica. Para el caso de los aislados encontrados en Venezuela estos reflejan mayor similitud al aislado histórico, presente en Europa en la década de 1840, probablemente reforzado por el uso exclusivo de semillas certificadas que existe en el país y para el cual el reservorio más probable serían papas nativas mantenidas hasta hace poco tiempo en regiones físicamente aisladas del resto de las zonas productoras, en las cuales las papas nativas muestran cierta tolerancia al patógeno.

Igualmente, Ruiz *et al.* (manuscrito en preparación), al analizar la estructura genética de la población venezolana de *P. infestans*, la distribución geográfica de los aislados que presentaron variabilidad pertenecientes a la población del Táchira, la caracterización de las poblaciones del patógeno en los países vecinos (Maldonado *et al.* 2002; Reis, 2003 y Vargas *et al.*, 2009) y la estructura de la población de *P. infestans* europea en la época de la hambruna, la cual es idéntica a la predominante en Venezuela (Gómez-Alpizar *et al.*, 2007), proponen que la población venezolana de este Oomycete tiene un origen europeo y se presume que sufre la entrada de un nuevo linaje desde Colombia. Sin embargo, para validar esta hipótesis es necesario hacer un análisis de secuencias del genoma mitocondrial de los aislados

venezolanos y compararlos con los recientemente publicados por Yoshida *et al.* (2013), quienes compararon el genoma de once aislados de herbario y de quince modernos, concluyendo que la epidemia del siglo XIX fue causada por un genotipo único, denominado HERB-1, el cual es distinto a todos los aislados modernos examinados, pero muy cercano al tipo US-1 encontrado en México en el siglo XX. Estos autores sugieren además, que HERB-1 y US-1 surgieron de una metapoblación que se estableció a principios de 1800 fuera del centro de diversidad.

En Venezuela, no es posible hacer una caracterización molecular de aislados de *P. infestans* encontrados en la época de la hambruna de Irlanda, ya que el único herbario en el país dedicado a la preservación de hongos, el cual fue fundado por Albert S. Muller en 1937, no cuenta con especímenes del organismo en estudio (Rojas *et al.*, 2010), a pesar de que el patógeno ya estaba presente en el país desde hacía varios años (Briceño *et al.*, 2009). No se conoce con exactitud el momento en que se registró por primera vez en Venezuela, pero según Adolfo Ernst, ya era bien conocido entre los productores para los años 1860s (Briceño *et al.*, 2009).

En cuanto a los aislados de *P. infestans* provenientes del estado Trujillo caracterizados en este trabajo y el nuevo genotipo encontrado, no es posible hacer ningún tipo de suposición, ya que no se conoce el lugar exacto de procedencia de cada aislamiento. Las muestras utilizadas en este trabajo provienen de parcelas experimentales diseñadas para probar el comportamiento ante la infección natural por *P. infestans* de ciertos clones de papa. Los aislados allí colectados fueron

llevados, sin la identificación necesaria para relacionar los aislamientos con el lugar de origen en el estado Trujillo, al Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAP-ULA, en ese momento a cargo del Prof. Luis Cedeño, quien proporcionó las muestras para esta caracterización.

Con el fin de profundizar en el estudio de la población de *P. infestans* en Venezuela y hacer una comparación más completa se hace necesario realizar un análisis de secuencias del genoma mitocondrial de los aislados encontrados en el país, muestrear los cultivos de papas encontrados en el estado Lara y en La Cordillera de La Costa para determinar las características de los aislados encontrados lejos de la zona fronteriza, comprobar si existen otras solanáceas cultivadas y silvestres que pudieran presentar infección por *P. infestans*, además de encontrar otros marcadores moleculares que permitan evidenciar las diferencias entre poblaciones obtenidas de diferentes hospedadores.

Como parte de los objetivos de este trabajo también se realizó un análisis de la secuencia del gen de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans* a fin de evaluar su potencial como marcador de fácil uso, incluyendo ensayos para la caracterización de esta enzima. El análisis realizado a la secuencia de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans* obtenida, muestra que codifica para el multidominio de las alcohol deshidrogenasas dependientes de Zinc, agrupándose en la superfamilia MDR,

Este es un grupo diverso de proteínas que muestra una amplia gama de actividades y se distinguen fácilmente de la familia de las deshidrogenasas de

cadena corta por su longitud (~250 aminoácidos vs los ~350 aminoácidos de la familia MDR). Las proteínas MDR tienen dos dominios: un sitio de unión Rossmann a NAD⁺ C-terminal, y un dominio catalítico N - terminal con homología distante a GroES (datos suministrados por CDD del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)).

El grupo MDR, como se mencionó anteriormente, contiene una gran variedad de actividades enzimáticas, incluyendo la fundadora, que es la actividad alcohol deshidrogenasa (ADH); también se pueden mencionar la quinona reductasa, sorbitol deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, DH butanodiol reductasa cetosa, reductasa cinamilo, entre otras. Las alcohol deshidrogenasas dependientes de zinc (ADH) catalizan la interconversión dependiente de NAD⁺ de alcoholes a aldehídos o cetonas. El sitio activo de zinc es coordinado por una histidina, dos cisteínas, y una molécula de agua (datos suministrados por CDD del NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>). Confirmando esta predicción la estructura tridimensional de la enzima muestra tres sitios de unión, uno para Nicotinamida Adenina-Dinucleótido (NAD⁺), otro para el ión Zinc y el último para el trifluoroetanol.

Inicialmente, se sospechó que la enzima cuya secuencia se propuso analizar se trataba de una manitol deshidrogenasa, capaz de catalizar la formación de fructosa a partir de manitol y viceversa, dependiendo de NAD⁺ o NADH, pero, hasta el momento no se tienen evidencias de que se trate de esta enzima. La manitol deshidrogenasa ha sido reportada para numerosas especies, para las cuales se ha

purificado y caracterizado desde hace varios años, concluyendo que tiene un papel importante en el proceso de infección del patógeno.

Manitol es un poliol, poli-alcohol o azúcar alcohólica, muy abundante en la naturaleza, y al cual se le han atribuido varias funciones, entre las que podemos mencionar carbohidrato de reserva, compuesto osmoregulador, regulación de coenzimas y almacenamiento de poder reductor, y es bien conocido como soluto compatible (Kavanagh *et al.*, 2002).

La mayoría de las manitol deshidrogenasas caracterizadas para hongos pertenecen a la familia de las hidrogenasas/reductasas de cadena corta, y las reportadas para plantas y algunos otros hongos pertenecen a las deshidrogenasas que contienen Zinc en la cadena media (Kavanagh *et al.*, 2002).

El análisis de la estructura cristalina de estas enzimas, pH dependientes, capaces de reducir fructosa a manitol acompañada de la oxidación de NADPH, ha permitido describir con cierto detalle el mecanismos catalítico (Fig. 32) y poner en relieve ciertos aspectos importantes de reconocimiento del sustrato; por ejemplo, la fructosa sólo de cadena abierta es capaz de unirse al sitio activo (Nuss *et al.* 2010).

Para el caso de los patógenos fúngicos animales y vegetales, Chaturvedi *et al.* (1996), mostró que mutantes con baja producción de manitol pierden la patogenicidad y la tolerancia al estrés. Adicionalmente, observó que al agregar manitol en cultivos de *Cryptococcus neoformans* incrementa su supervivencia *in vitro*. Posteriormente, se propuso que en *C. neoformans* el manitol sirve para

proteger al hongo de daños oxidativos causados por las especies reactivas de oxígeno producidas por el hospedador (Voegelé *et al.*, 2005).

En el caso de hongos fitopatógenos también se ha visto la acumulación de manitol, encontrando grandes cantidades de este poliol en el apoplasto, llevando a suponer que su papel, igual que el caso de hongos patógenos animales, es suprimir la respuesta de defensa del hospedador.

En el trabajo publicado por Voegelé *et al.* (2003), se describe el proceso de la toma de nutrientes por el haustorio de fitopatógenos biotróficos, afirmando que la enzima manitol deshidrogenasa es responsable de la utilización del sustrato por el transportador de carbohidratos Hxt1p ya que, su producción es de libre difusión por el micelio e inaccesible para el hospedador.

En cuanto al análisis filogenético realizado con la secuencia de la manitol deshidrogenasa de *P. infestans* es necesario tomar en cuenta que muchas de las secuencias reportadas no están caracterizadas y pertenecen a proteínas putativas. Sin embargo, se verificó que la manitol deshidrogenasa ha sido descrita en bacterias, pero se ha estudiado para muy pocos grupos eucariotas microscópicos; las secuencias reportadas en su mayoría pertenecen a hongos, algunos animales y un alga roja. El árbol filogenético obtenido no nos proporciona evidencia de la monofilia del grupo de los Stramenopiles, sino que las secuencias reportadas para el género *Phytophthora* son agrupada con varios hongos, quedando estrechamente

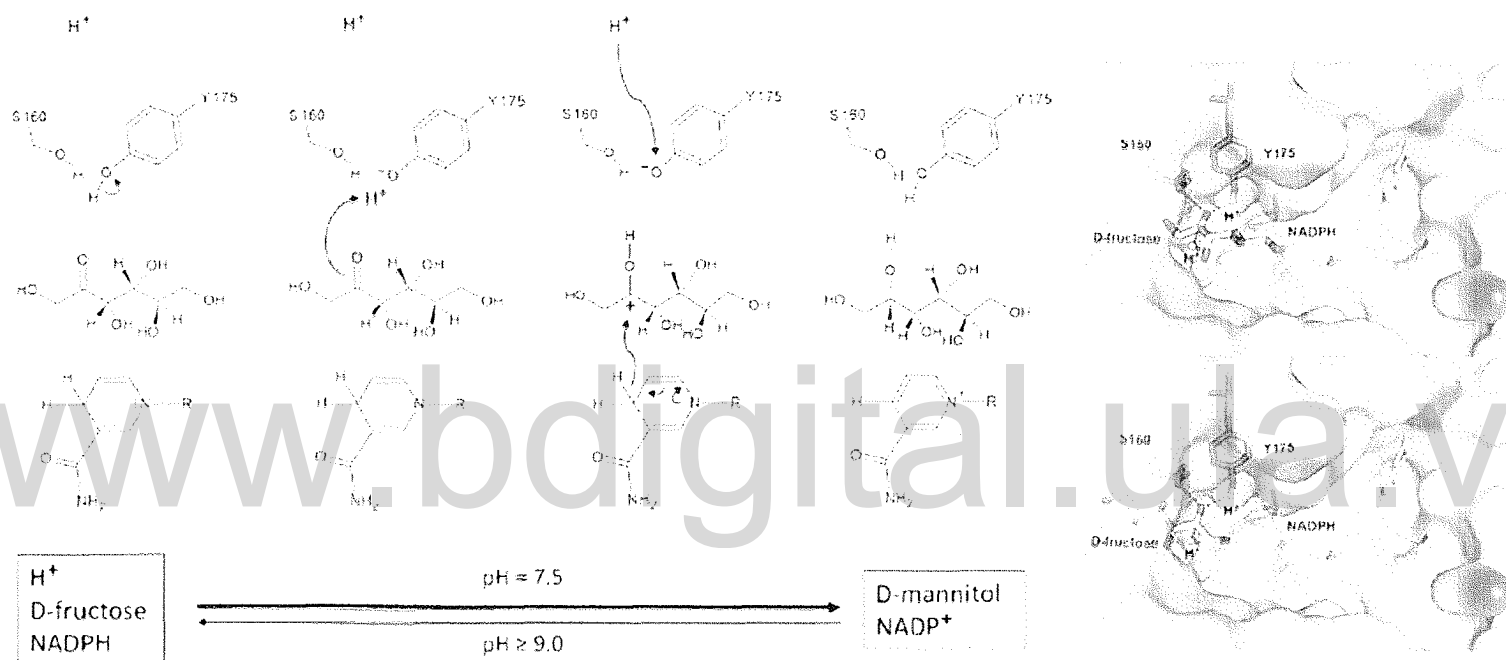


Figura 32. Mecanismo catalítico y modelo de unión al sustrato de la manitol deshidrogenasa de *Cladosporium herbarum* (Nuss *et al.*, 2010).

relacionada con *Phaffia rhodozyma*. Por otro lado, como se esperaba, esta enzima tiende a semejarse más entre especies pertenecientes a los Peronosporales (Fig. 24).

Finalmente, en este trabajo se realizó un análisis de aislados de *Pythium insidiosum* provenientes de lesiones en caballos. En esta etapa del trabajo sólo se lograron amplificar por PCR los SSR *Pi2H* y *Pi4G*, además de las regiones *ITS4* y *B1*. Con el resto de los iniciadores probados (SSR *PiG11* y *Pi4B*, genes *Ras*, *MDH*, *Cox1*, *Avr3a*) no se obtuvo éxito a la hora de obtener el amplicón, posiblemente por la baja similitud entre los iniciadores y el ADN molde.

A partir de la amplificación del locus *B1*, se logró realizar la prueba de restricción obteniendo que dicha región en *Pythium insidiosum* es idéntica a la de *P. infestans* aislado de plantas de papa de los estados Mérida, Trujillo y Táchira con haplotipo mitocondrial Ia, de acuerdo al análisis de restricción. El mismo resultado se obtuvo para los microsatélites estudiados (SSR *Pi2H* y *Pi4G*).

Es decir, de cuatro iniciadores utilizados, para sólo dos de ellos se pudo confirmar la transferibilidad entre las especies, encontrando amplificadores idénticos a los obtenidos para *P. infestans*. En el caso del microsatélite denominado *Pi2H*, el cual se ha reportado como monomórfico, se encontró una banda de aproximadamente 130 pb, igual a la encontrada para *P. infestans*. En el caso de la región *Pi4G*, la cual presenta polimorfismo en la población de *P. infestans* estudiada, se encontró una banda de aproximadamente 350 pb similar a la reportada para los aislados de *P. infestans* encontrados en plantas de papa del

estado Mérida, Trujillo y Táchira con haplotipo mitocondrial Ia, lo cual coincide con el resultado encontrado para el locus *B1*, permitiendo así observar la transferibilidad de métodos para el estudio de poblaciones de *P. infestans* en otros patógenos pertenecientes al mismo grupo taxonómico.

Los fitopatógenos presentan ciertas facilidades a la hora de ser estudiados, ya que al no ser infectivos en humanos, no hay riesgo de contagio y pueden ser trabajados en laboratorios con bajos nivel de bioseguridad (1 o 2) sin problemas. También el aislamiento y cultivo de estos microorganismos fitopatógenos es más sencillo; en algunos casos existen patógenos animales que no pueden ser aislados dificultando aun más su estudio. De esta forma, se presenta el sistema de interacción patógenos-hospedador en plantas en como un modelo exitoso para el estudio de patógenos animales.

Se han publicado varios trabajos donde se reportan similitudes entre patógenos animales y vegetales. Uno de ellos es el publicado por Rahme *et al.* (2000), donde se describen factores de virulencia comunes en bacterias patógenas animales y de plantas. Estos autores exploraron la habilidad de *Pseudomonas aeruginosa* para infectar una variedad de hospedadores vertebrados e invertebrados, desarrollando un sistema modelo que usa plantas y nemátodos como candidatos para estudios en mamíferos, y así ayudar a dilucidar las bases moleculares de la patogénesis por dicha bacteria.

También en bacterias patógenas animales y vegetales se ha descrito la misma maquinaria de secreción tipo III para inyectar proteínas de virulencia dentro de su hospedador. Muchos componentes de este sistema en ambos tipos de patógenos son conservados (Anderson *et al.*, 1999).

En el caso de patógenos fúngicos también se han propuesto varios modelos para comparar las infecciones en plantas y humanos, ya que para fitopatógenos se han hecho mayor número de estudios y se han descubierto múltiples mecanismos de patogenicidad. El análisis de la comparación de la interacción con hongos fitopatógenos y otros hospedadores como insectos, distintas plantas y también entre hongos no patogénicos y patogénicos, han permitido describir múltiples factores de virulencia y cascadas de señalización comunes. También las recientes tecnologías han permitido identificar diferencias y similitudes entre patógenos y sus diferentes mecanismos de enfermedad (Sexton y Howlett, 2006).

En la Fig. 33 se muestra la comparación entre los mecanismos de infección de hongos pertenecientes al grupo de los Ascomycetes patógenos de plantas y animales, donde podemos observar la gran similitud que existe entre éstos. Sin embargo, es importante resaltar que no en todos los casos podemos hacer estas comparaciones ya que existe una gran diversidad de mecanismos de infección en hongos, y parece que hay pocos factores de patogenicidad universales dentro de este grupo ya que un mecanismo de patogenicidad puede que sea descrito para unos pocos hongos y que no pertenezca a muchos otros (Sexton y Howlett, 2006).

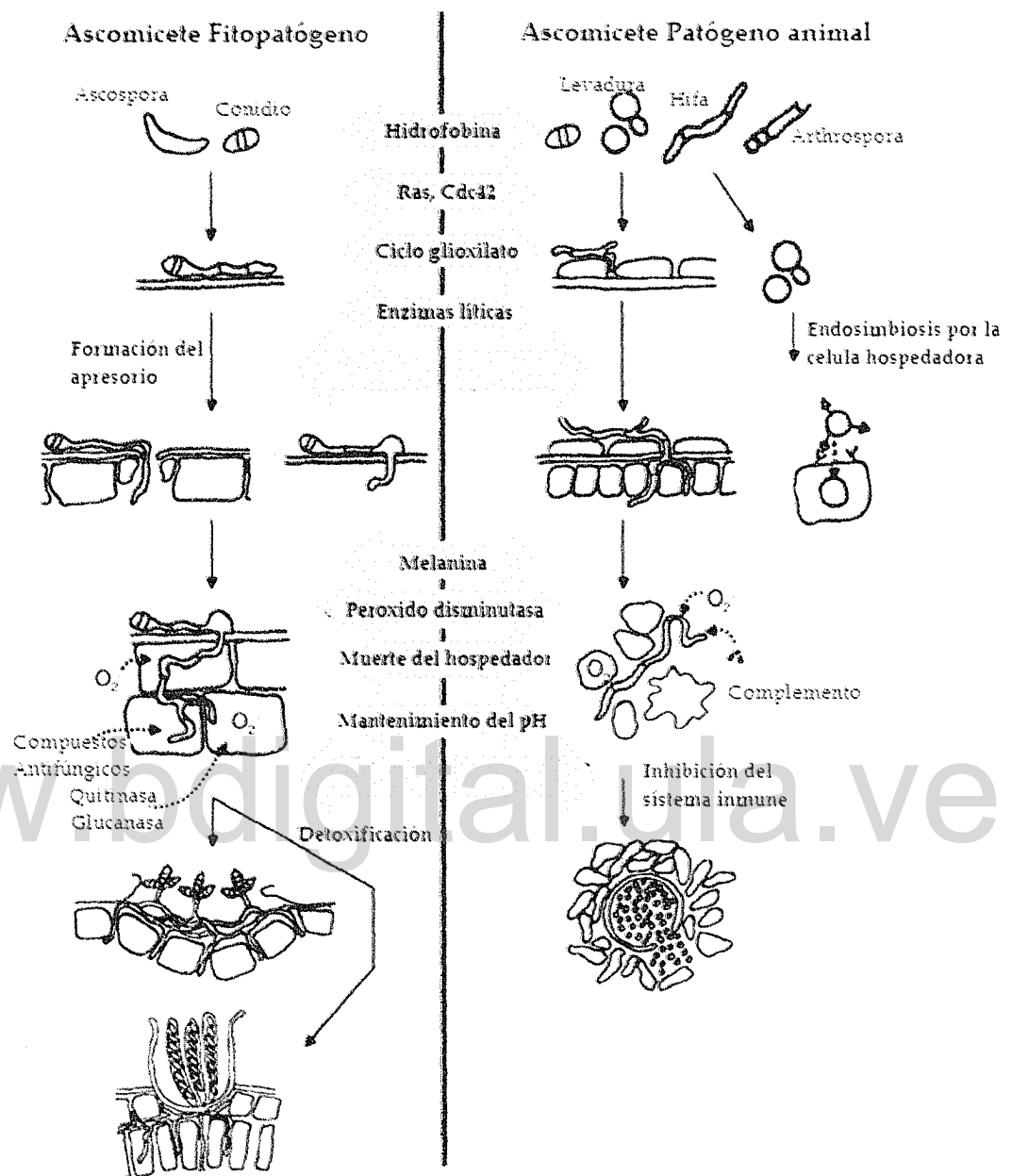


Figura 33. Comparación del mecanismo de infección descrito en ascomicetes patógenos de plantas y animales (Sexton y Howlett, 2006).

Sin embargo, vale la pena tomar en cuenta la transferibilidad de las técnicas y marcadores moleculares en el estudio poblacional de patógenos de plantas y animales. Los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores, permitiendo en un futuro analizar poblaciones de aislados de *Pythium insidiosum* provenientes de distintos hospedadores en varias regiones del mundo con el fin de conocer más sobre su origen y posibles vías de dispersión.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El locus *B1* cumple con las características de un marcador molecular eficiente para caracterizar la población de *P. infestans*, y se recomienda analizar este locus en poblaciones de otros organismos perteneciente al grupo de los Oomycetes, ya que al igual que en la población de *P. infestans*, en los aislados de *Pythium insidiosum* que se lograron analizar, se consiguió amplificar y analizar el patrón de restricción de esta región, permitiendo suponer que podrían encontrarse diferencias poblacionales también en este caso.
- Existen diferencias al observar el proceso de infección en folíolos de papa de aislados de *P. infestans* provenientes de plantas de papa y tomate, en cuanto al tiempo de aparición y tamaño de la lesión; y al comparar las secuencias de distintos genes amplificados a partir de estos mismos aislados también se encuentran diferencias significativas para el caso de la secuencias del gen

Ras y el locus *B1*, lo cual al analizarlo junto con los hallazgos encontrados en trabajos anteriores (análisis de microsatélites), nos permite afirmar que existen diferencias importantes entre aislados dependiendo de su hospedador. Concluyendo que no se trata de la misma población del patógeno y que existe una marcada especificidad entre estos aislados. Lo cual también podría suceder al analizar aislados de *P. insidiosum* provenientes de distintos animales hospedadores. Para complementar el trabajo realizado en la población venezolana es necesario continuar el muestreo realizado hasta el momento, con el fin de encontrar Solanáceas distintas a papa y tomate infectadas por este patógeno e incluirlas en el análisis poblacional. Vale la pena resaltar que el esfuerzo en este aspecto no ha sido poco, ya que desde el año 2005 hasta el presente, el Dr. Gustavo Fermin y su grupo de investigación en sus distintos trabajos de campo han tomado tiempo en observar detenidamente las distintas Solanáceas silvestres y de cultivo, sin tener éxito a la hora de ver síntomas de infección por *P. infestans* (Excepto en Colombia donde el mencionado investigador encontró el aislado IIa en Uchuva).

- Al incluir en la caracterización de la población venezolana los aislados de *P. infestans* encontrados en plantas de papa de cultivo del estado Trujillo y de plantas de papas nativas de las regiones de Gavidia y Mocoa del estado Mérida, se añadieron evidencias de la homogeneidad de la población venezolana antes reportada y sus diferencias al compararla con el resto de

los aislados caracterizados en los países vecinos (Briceño *et al.*, 2009; Cárdenas *et al.*, 2011). Al analizar el origen de la población venezolana, asegurando que las semillas de papa utilizadas en el país son certificadas, tomando en cuenta la estructura de la población de *P. infestans* europea en la época de la hambruna, la cual es idéntica a la predominante en Venezuela (Gómez-Alpizar *et al.*, 2007), y al confirmar en este trabajo la homogeneidad de la población con respecto a los aislados de plantas de papa nativas, podemos suponer que los aislados de *P. infestans* que infectan los cultivos de nuestro país tiene un origen Europeo y podría haberse mantenido a lo largo del tiempo infectando plantas de papas nativas. En el caso de *Pythium insidiosum* donde se conoce como sitio de origen Tailandia, pero no se han descrito las vías de migración o dispersión de este patógeno, el uso de este tipo de análisis podría aclarar en gran manera esta interrogante.

- Debido a las características de la manitol deshidrogenasa mencionadas anteriormente, esta enzima es un blanco ideal para la investigación de la interacción patógeno-hospedador tanto en animales como vegetales. En este trabajo se comenzó con la caracterización de la enzima de *P. infestans*, dejando material importante para trabajos que puedan realizarse posteriormente. Se propone hacer un análisis exhaustivo del gen clonado, con el fin de verificar la presencia de codones raros en el sistema de expresión heterólogo seleccionado e incluir análisis de Northern blot.

- Con los resultados obtenidos al analizar los aislados de *Pythium insidiosum* con el método utilizado para la caracterización de población de *P. infestans*, se confirma la hipótesis inicial donde afirmamos que los métodos de estudio de patógenos de plantas pueden ser transferibles al estudio de patógenos animales pertenecientes a los mismos grupos taxonómicos.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS

- Abad, G. y Abad, J. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. *Plant Disease*, **81**:682-688.
- Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Linn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegle, F. y Taylor, M. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal Eukaryotes Microbiological*, **52**: 3399-451.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Elsevier, Academic Press. Quinta Edición. New York.
- Anderson, D., Fouts, D., Collmer, A. y Schneewind, O. 1999. Reciprocal secretions of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**:12839-12843.
- Arnald, K., Bordoli, L., Kopp, J. y Schwere, T. 2006. The Swiss Model Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling, *Bioinformatics*, **22**: 195-201.
- Ausina, V. y Moreno, S. 2006. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Bailey, C. 2010. Stramenopiles. *The Tree of Life Web Project*. <http://tolweb.org/Stramenopiles/2380/2010.04.28> , <http://tolweb.org/>. Revisado el 28 de febrero de 2013.
- Becktell, M., Smart, C. y Haney, C. 2006. Host-pathogen interactions between *Phytophthora infestans* and the solanaceous host *Calibrachoa x hybridus*, *Petunia x hybrida*, and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Disease*, **90**:24-32.

- Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijine, G. y Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal Molecular Biology*, **340**: 783-795.
- Benov, L. y Al-Ibraheem, J. 2002. Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **35**: 428-431.
- Berryessa, N., Marks, S., Pesavento, P., Krasnansky, T., Yoshimoto, S., Johnston, E., y Grooters, A. 2008. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **22**: 1065-1069.
- Briceño, A., Cedeño, L., San Román, M., Moreno, M., Quintero, K., Pino, H y Fermin, G. 2009. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Venezuelan Andes (2004-2007). *Acta Horticulturae*, **834**:129-140.
- Boscán, K. 2009. Un aporte para la caracterización de las papas nativas merideñas. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae* en Biología Celular. Universidad de Los Andes (ULA).
- Calvano, T., Blatz, P., Vento, T., Wickes, B., Sutton, D., Thompson, E., White, C., Renz, E. y Hospenthal, D. 2011. *Pythium aphanidertum* infection following combat trauma. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 3710-3713.
- Cárdenas, M., Grajeles, A., Sierra, R., Rojas, A., Gonzales-Almario, A., Vargas, A., Marín, M., Fermin, G., Lagos, L., Grünwald, N., Bernal, A., Salazar, C. y Restrepo, S. 2011. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean Region. *BMC Genetics*, **12**: 1471-2156.
- Castillo-Jiménez, M., Baptista-Díaz, N., Montero, J. y Pascual, A. 2013. Infección ocular por *Pythium insidiosum*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 118-122.
- Catal, M., King, L., Tumbalam, P., Wiriyajitsomboon, P., Kirk, W. y Adams. G. 2010. Heterokaryotic nuclear conditions and a heterogeneous nuclear population are observed by flow cytometry in *Phytophthora infestans*. *Cytometry*, **77**: 769-775.

- Cedeño, L., Fermin, G., Mora, A., Moreno, M., Briceño, A., Quintero, K., San Román, M. y Moreno, M. 2008. Medios de cultivo alternativos para aislar *Phytophthora infestans* de folíolos de papa. *Fitopatología Venezolana*, **21**: 34-40.
- Chareonsirisuthigul, T., Khositnithikul, R., Intaramat, A., Inkomlue, R., Sriwanichrak, K., Piromsontikorn, S., Kitiwanwanich, S., Lowhnoo, T., Yingyong, W., Chaiprasert, A., banyong, R., Ratanabanangkoon, K., Brandhorst, T. y Krajaejun, T. 2013. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pitiosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **76**:42-45.
- Chaturvedi, V., Flynn, T., Niehaus, W. y Wong, B. 1996. Stress tolerance and pathogenic potential of mannitol mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, **142**:937-943
- Chung, C., Niemela, S. y Miller, R. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proceedings of the National Academy of Science*, **86**: 2172-2175.
- Cohen, Y., Farkash, S., Reshit, Z. y Baider, A. 1996. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology*, **87**: 191-197.
- Cvitanich, C. y Judelson, H. 2003. A gene expressed during sexual and asexual sporulation in *Phytophthora infestans* is a member of the Puf family of translational regulators. *Eukaryotic Cell*, **2**: 465-473.
- De Cock, A., Mendoza, L., Padhye, A., Ajello, L., Kaufman, L., 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of Pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **25**: 344-349.
- Deahl, K., Goth, R., Young, R., Sinden, S. y Gallegly, M. 1990. Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in potato fields in the United State and Canada. *Phytopathology*, **80**: 670.

- Erwin, D. y Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* disease worldwide. The American Phytopathological Society.
- Fabritius, A., Cvitanich, C. y Judelson, H. 2002. Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*. *Molecular Microbiology*, **45**:1057-1066.
- Fernandes, C., Giordani, C., Grecco, F., Sallis, E., Stainki, D., Gaspar, L., Garcez, C. y Nobre, M. 2012. Gastric pythiosis in a dog. *Revista Iberoamericana de Micología*, 10.1016/j.riam.2012.01.002
- Fry, W., Goodwin, S., Dyer, A., Matuszak, J., Drenth, A., Koh, Y., Cohen, B., Spielman, L., Tooley, P., Deahl, K., Inglis, D., Sujkowski, L. y Sandian, K. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease*, **77**:653-661.
- Fry, W. y Grünwald, N. 2010. Introduction to the Oomycetes. *The plant health instructor*, DOI: 10.1094.
- Gaastra, W., Lipman, L., De Cock, A., Exel, T., Pegge, R., Scheurwatwr, J., Vilela, R. y Mendoza, L. 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology*, **146**: 1-16.
- Giménes, S., Bagagli, E., Araújo, J., Grisi, J., de Franco, N., Alencar, M., Mendoza, L., Pires, R. y Alencar, S. 2005. Human Pitiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 715-718.
- Gómez, L., Thorne, J. y Ristaino, J. 2003. Molecular evolution of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **93**: S29.
- Gómez-Alpizar, L., Carbone, I. y Ristaino, J. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear genes genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**:3306-3311.
- Gómez-Alpizar, L., Hu, C., Oliva, R., Forbes, G. y Ristaino, J. 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*, **4**: 590-602.

Görnhardt, B., Rouhara, I. y Schmelzer, E. 2000. Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins, *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**: 32-42.

Griffith, W. y Shaw, D. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:4007-4014.

Grooters, A. y Gee, M. 2002. Development of nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **2**: 147-152.

Goss, E., Cardenas, M., Myers, K., Forbes, G, Fry, W. Restrepo, S. y Grünwald, N. 2011. The plant pathogen *Phytophthora andina* emerged via hybridization of an unknown *Phytophthora* species and the Irish potato famine pathogen, *P. infestans*. *PLoS ONE*, **9**: 1-9.

Guarro, J., Gene, J. y Stchigel, M. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**:454-500.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**:95-98.

Hardham, A. 2001. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology*, **30**: 91-98.

Hardham, A. 2007. Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cellular Microbiology*, **9**:31-39.

- Hardham, A. y Shan, W. 2009. Cellular and molecular biology of *Phytophthora*-plant interaction. *Plant Relationships*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2^{da} edición.
- Henfling, J. 1987. Late Blight of Potato (*Phytophthora infestans*). Boletín 4. Segunda edición. Centro Internacional de la Papa (CIP). Perú.
- Imwidthaya, P. 1994. Human pythiosis in Thailand. *Postgraduate Medical Journal*, 70: 558-560.
- Jaramillo, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Jones, R. y Ospina-Giraldo, M. 2011. Novel cellulose-binding domain protein in *Phytophthora* is cell wall localized. *PLoS ONE*, 6: e23555.
- Judelson, H., Spielman, L. y Shattock, R. 1995. Genetic mapping and non-mendelian segregation of mating type loci in the Oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics*, 141:503-512.
- Judelson, H. 1996. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular and General Genetics*, 252:155-161.
- Judelson, H., Ah-Fong, A., Aux, G., Avrova, A., Bruce, C., Cakir, C., Cunha, L., Grenville-Briggs, L., Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Meijer, H., Robert, S., Thurber, C., Whisson, S., Birch, P., Govers, F., Kamoun, S., van West, P. y Windass, J. 2008. Gene expression profiling during asexual development of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* reveals a highly dynamic transcriptome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 433-447.
- Kamoun, S. 2001. *Phytophthora*. The Ohio State University-Ohio Agricultural Research and Development Center, Chapter 1: 1-29.
- Kamoun, S. 2003. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2: 191-199.

- Kavanagh, K., Klimacek, M., Nidetzky, B. y Wilson, D. 2002. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 43433-43442.
- Keeling, P., Brian, S., y Simpson, A. 2009. Eukaryotes. Eukaryota, Organisms with nucleated cells. Version 28. <http://tolweb.org/Eukaryotes/3/2009.10.28>, en The Tree of Life Web Project.
- Knapova, G. y Gisi, U. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*, **51**: 641-653.
- Knapova, G., Tenzer, I., Gessler, C. y Gisi, U. 2001. Characterization of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with molecular markers. Proceeding of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, 6-9.
- Krajaejum, T., Sathapatayavong, B., Prachartam, R., Nitiyanant, P., Leelachaikul, P., Wanachiwanawin, W., Chaiprasert, A., Assanasen, P., Saipetch, M., Mootsikapun, P., Chetchotisakd, P., Lekhakula, W., Winyou, M., Kalnauwakul, S., Supparatpinyo, K., Chaiwarith, R., Chiewchanvit, S., Tananuvat, N., Srisiri, S., Suankratay, C., Kulwichat, W., Wongsaisuwat, M. y Somkaew, S. 2006. Clinical and epidemiological analyses of human Pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, **43**: 569-576.
- Kroon, L., Bakker, F., Van den Bosch, G., Bonants, P y Flier, W. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequence. *Fungal Genetics and Biology*, **41**: 766-782.
- Levesque, A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J., Holt, C., Huitema, E., Raffaele, S., Robodeau, G., Thines, M., Win, J., Zerillo, M., Beakes, G., Boore, J., Busam, D., Dumas, B., Steve, F., Fuerstenberg, S., Gachon, C., Gaulin, E., Govers, F., Grenville-Briggs, L., Horner, N., Hostetler, J., HY Jiang, R., Johnson, J., Krajaejun, T., Lin, H., JG Meijer, H., Moore, B., Morris, P., Phuntmart, V., Puiu, D., Shetty, J., Stajich, J., Tripathy, S., Wawra, S., van West, P., Whitty, B., Coutinho, P., Henrissat, B., Martin, F., Thomas, P., Tyler, B., De Vries, R., Kamoun, S., Yandell, M., Tisserat, N. y Buell, R. 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum*

reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology*, **11**: R73.

Maldonado, L., Delgado, M. y García, C. 2002. Estudio de la estructura genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* en las regiones productoras de papa de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. RedePapa, documentos, información general. <http://www.redepapa.org/infogeneral.html>.

Marchler-Bauer, A. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, **37**(D):205-10.

Mendoza, L. y Newton, J. 2005. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology*, **6**: 477-486.

Mendgen, K. y Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Sciences*, **7**:352-356.

Moreno, M. 2006. Contribución a la caracterización poblacional de *Phytophthora infestans* en los estados andinos de Venezuela a través de marcadores moleculares y análisis aloenzimáticos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para el optar al grado de *Magister Scientiae* en Biología Celular. Universidad de Los Andes (ULA).

Nicholas, K. y Nicholas B. 1997. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Versión 2.7.000.

Niehaus, W. y Dilts, R. 1982. Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology*, **151**:243-250.

Nuss, D., Goetting, P., Magler, I., Denk, U., Breitenbach, M., Schneider, P., Brandstetter, H. y Simon-Nobbe, B. 2010. Crystal structure of the NADP-dependent mannitol dehydrogenase from *Cladosporium herbarum*: implications for oligomerisation and catalysis. *Biochimie*, **92**:985-993.

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M., Caracuel, Z., Roncero, M., Mayayo, E. y Di Pietro, A. 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for genetics

dissection of fungal virulence in plant and mammals. *Infection and Immunity*, **72**: 1760-1766.

Patterson, D. 2000. Parasitic Protists. Tree of Life web project. <http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>. Consultado el 15 de agosto de 2012.

Pires, L., Bosco, S., da Silva, N. y Kurachi, C. 2013. Photodynamic therapy for pythiosis. *Veterinary dermatology*, **24**: 130-138.

Qi, J.; Asano, T.; Jinno, M.; Matsui, K.; Atsumi, K.; Sakagami, Y. y Ojika, M. 2005. Characterization of a *Phytophthora* mating hormone. *Science*, **309**:1828.

Rahme, L., Ausubel, F., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B., au, G., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M., Tsongais, J., Walendziewicz, C. y Tompkins, R. 2000. Plant and animals share functionally common bacteria virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 8815-8821.

Ristaino, J. B. 2006. Tracking the evolutionary history of the potato late blight pathogen with historical collections. *Outlooks on Pest Management*, DOI: 13.1564.

Reis, A. 2003. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from southern and southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease*, **87**: 896-900.

Robold, A. y Hardham, A. 2005. During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Current Genetics*, **47**:307-315.

Robideau, G. de Cock, A., Coffey, M., Voglmayr, H., Brouwer, H., bala, K., Chitty, D., Desaulniers, N., Eggertson, Q., Gachon, C., Hu, C.,m Küpper, F., Rintoul, T., Sarhan, E., Verstappen, E., Zhang, Y., Bonants, P., Ristaino, J. y Lévesque, C. 2011. DNA barcoding of Oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, **11**:1002-1011.

- Rojas, T., Caruso, D., Pons, N. y Diamont, D. 2010. Type specimens in the mycological herbarium "Albert S. Muller" (VIA), Venezuela. *Mycotaxon*, **112**: 1-4.
- Salas, Y., Marquez, A., Corro, A. y Colmenares, V. 2009. Macroscopic and microscopic characterization of dog gastrointestinal Pitiosis in Venezuela. *Revista de la facultad de ciencias veterinarias*, 50: 23-31.
- Salipante, S., Hoogestraat, D., SenGupta, D., Murphey, D., Panayides, K., Hammilton, E., Castañeda-Sánchez, I., Kennedy, J., Monsaas, P., Mendoza, L., Stephens, K., Dunn, L. y Cookson, B. 2012. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection by use of PCR screening and DNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **12**:1480-1483.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sansome, E. y Brasier, C. 1973. Diploidy and chromosomal structural hybridity in *Phytophthora infestans*. *Nature*, **461**:344-345.
- Senda, M., Kageyama, K., Suga, H. y Lévesque, A. 2009. Two new species of *Pythium*, *P. senticosum* and *P. takayamanum*, isolated from cool-temperate forest soil in Japan. *Mycology*, **101**: 439-448.
- Sexton, A. y Howlett, B. 2006. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal. *Eukaryotic Cell*, **5**:1941-1949.
- Shenep, J., English, K., Kaufman, L., Pearson, T., Thompson, J., Kaufman, R., Frisch, G. y Rinaldi, M. 1998. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clinical Infectious Disease*, **27**: 1388-1393.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gobson, T., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. y Higgins, D. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, **7**: 539.

- Szabo, L. y Bushnell, W. 2001. Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 7654-7655.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. y Kumar, S. 1993-2013. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *Iology and Evolution*, **30**: 2725-2729.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**:4876-4882.
- Tooley, P. y Therrien, C. 1987. Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. *Experimental Mycology*, **11**:19-26.
- Vanittanakom, N., Supabandhu, J., Khamwan, C., Praparattanapan, J., Thirach, S., Prasertwitayakij, N., Louthrenoo, W., Chiewchanvit, S. y Tananuvat, N. 2004. Identification of emerging human-pathogenic *Phytium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. *Journal of clinical microbiology*, **42**:3970-3974.
- van West, P., Shepherd, S., Walker, C. ,Li, S., Appiah, A., Grenvie-Briggs, L., Govers, F. y Gow, N. 2008. Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans* is established through chromatin remodeling. *Microbiology*, **154**: 1482-1490.
- Vargas, A., Quesada, L., Céspedes, M., Carreño, L., Gonzáles, A., Rojas, A. y Restrepo, S. 2009. Characterization of *Phytophthora infestans* Populations in Colombia: First Report of the A2 Mating Type. *Phytopathology*, **99**: 82-88.
- Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3688-3691.
- Voegelé, R., Struck, C., Hahn, M. y Mendgen, K. 2001. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 8133-8138.

Voegelé, R. y Mendgen, K. 2003. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, **159**:93-100.

Voegelé, R., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I. y Mendgen, K. 2005. Possible roles for manitol and manitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiology*, **137**:190-198.

Wanachiwanawin, W., Mendoza, L., Visuthisakchai, S., Mutsikapan, P., Sathapatayavong, B., Chaiprasert, A., Suwanagool, P., Manuskiatti, W., Ruangsetakit, C. y Ajello, L. 2004. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine*, **27**: 3613-3621.

White, T., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press*, 315-322.

Yeh, F. C., Yang, R. y T. Boyle. 1999. POPGENE VERSION 1.31. Microsoft Window-based freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research. Canada.

Yoshida, K., Schuenemann, V., Cano, L., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., Lanz, C., Martin, F., Kamoun, S., Krause, J., Thines, M., Weigel, D., y Burbano, H. 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife*, **2**: 00731.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Computational Biology*, **7**(1-2):203-14.

ANEXOS

1. Códigos, lugar de origen, hospedador y características genéticas de los aislados de *Phytophthora infestans* utilizados en este trabajo

Código	Hospedador	Lugar de origen	Tipo de talo	Haplotipo mitocondrial
A1	Papa	CIP*	A1	-
A2	Papa	CIP*	A2	-
EVC1.1-09/EV1	Tomate	Mérida (El Vallecito)	A1	Ia
EVC1.2-09/EV2	Tomate	Mérida (El Vallecito)	A1	Ia
EVC1.3-09/EV3	Tomate	Mérida (El Vallecito)	A1	Ia
SBT1.1-09/SB1	Tomate	Mérida (Sabanota)	A1	Ia
SBT1.2-09/SB2	Tomate	Mérida (Sabanota)	A1	Ia
SR1.8-09/SR1	Papa	Mérida (Santa Rosa)	A1	Ia
TCH1.1-05	Papa	Táchira (La Grita)	A1	Ia
TCH2.2-05	Papa	Táchira (Las Porqueras)	A1	IIa
TCH16.5-05	Papa	Táchira (Las Porqueras)	A1	Ia
TCH18.2-05	Papa	Táchira (Paramo del Tamá)	A1	IIa
V 86.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 87.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 88.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 90.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 91	Papa	Mérida	A1	Ia
V 92.ST	Papa	Mérida	A1	Ia

V 93.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 94.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 95.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
V 96.ST	Papa	Mérida	A1	Ia
TUC 1.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 1.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 1.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 2.4-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 2.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 2.6-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 3.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 3.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 3.4-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 3.10-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 4.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 4.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 5.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 6.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 6.4-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 6.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 7.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 7.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 7.6-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 7.7-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 8.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 8.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 8.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 8.6-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 9.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 9.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 10.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 11.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia

TUC 12.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 12.4-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 12.6-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 13.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 13.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 14.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 14.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 14.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 15.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 15.5-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 15.6-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 16.1-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
TUC 16.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
MOC 1.3-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
MOC 1.6-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
MOC 1.8-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
GAV 1.4-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
GAV 1.7-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
GAV 1.8-07	Papa	Trujillo	A1	Ia
GAV 1.2-07	Papa	Trujillo	A1	Ia

* Centro Internacional de la Papa.

2. Códigos de los aislados de *Pythium insidiosum* utilizados en este trabajo

Códigos de Aislados de *P. insidiosum*

Eq3

Eq4

Eq6

Eq8

Eq12

Eq13

Eq14

3. Números de accesoión de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético utilizando la secuencia de aminoácidos de la enzima manitol deshidrogenasa.

Especie	Número de accesoión
<i>Phytophthora parasitica</i>	ETM03226.1
<i>Phytophthora sojae</i>	EGZ19663.1
<i>Piriformospora indica</i>	CCA68918.1
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	EMS25334.1
<i>Phaffia rhodozyma</i>	AAQ04223.1
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	XP_007267713.1
<i>Trametes versicolor</i>	XP_008042467.1
<i>Dichomitus squalens</i>	XP_007369910.1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_571772.1
<i>Tremella mesenterica</i>	XP_007005736.1
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	XP_007869375.1
<i>Dacryopinax</i> sp	EJU01966.1
<i>Ustilago hordei</i>	CCF53134.1
<i>Stereum hirsutum</i>	XP_007301496.1
<i>Pseudozyma brasiliensis</i>	EST07927.1
<i>Ustilago maydis</i>	XP_758131.1
<i>Moniliophthora roreri</i>	XP_007855888.1
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	GAC92580.1
<i>Candida maltosa</i>	ADM08008.1
<i>Sporisorium reilianum</i>	CBQ72223.1
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	BAN45671.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	CCO37504.1
<i>Fusarium graminearum</i>	EYB25898.1
<i>Chondrus crispus</i>	XP_005719076.1

4. Códigos de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el ensayo de clonación y expresión de la manitol deshidrogenasa de *Phytophthora infestans*

Código	Característica de la cepa	Genotipo
BL21(DE3)	Cepa utilizada para los ensayos de expresión y verificación de actividad enzimática	<i>fluA2 [lon] ompT gal (λDE3) [dcm] ΔhsdS (λDE3=λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::lacI::PlacUV5::T7 gene 1) i21 Δnin5)</i>
XL1-Blue	Cepa utilizada para la clonación	<i>recA1 andA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac^f ZAM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
35	BL21(DE3) portadora del plásmido pET28a con el inserto sentido	
15	BL21(DE3) portadora del plásmido pET28a con el inserto antisentido	
Lin239	Cepa utilizada como control en ensayos de actividad enzimática	