

Relación filogenética de cepas de *Pythium irregulare* sensu lato de Long Island, New York en base al análisis de secuencias del gen β -tubulina.

Fernanda Proaño¹, Alma Koch¹, Pedro Romero¹, Carla D. Garzon² y Patricia A. Garrido²

¹Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, Departamento Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador.

²Departamento de Entomología y Fitopatología, Universidad Estatal de Oklahoma (OSU), Stillwater, OK

Resumen—*Pythium irregulare* es una importante especie patógena de plantas encontrada alrededor del mundo. Estudios de tipo morfológicos y moleculares han confirmado que *Pythium irregulare* sensu lato muestra altos niveles de diversidad morfológica y genética y que forma parte de un complejo de especies. Una colección internacional de 120 aislados de invernaderos de Long Island - New York de diversos huéspedes fueron seleccionados para investigar su relación filogenética. El análisis filogenético fue realizado en base a la caracterización del gen β -tubulina. Fragmentos de aproximadamente 1200 pb del gen β -tubulina fueron amplificados con el primer sentido β tub_F1A y el primer antisentido β tub_R1A. En el análisis bajo el método de máxima verosimilitud se incluyeron seis secuencias, cuatro correspondientes a especies del complejo *Pythium irregulare* (*P. irregulare* sensu stricto, *P. cryptoirregulare*, *P. cylindrosporum*) y las secuencias de *Pythium spinosum* y *Pythium sylvaticum* usadas como grupos externos. El árbol filogenético consenso obtenido reveló la formación de tres grupos principales con un soporte "bootstrap" moderado-alto (Valor $p < 0.05$). Los resultados no mostraron una clara separación entre las especies del complejo *P. irregulare*, lo cual es consistente con otros estudios preliminares. La discriminación entre las especies de este complejo es fundamental para el estudio de su epidemiología y para el manejo de las enfermedades que causa.

Palabras clave: *Pythium irregulare*, sensu lato, Filogenética, Máxima verosimilitud, Bootstrap

Abstract—*Pythium irregulare* is an important plant pathogenic species found around the world. Morphological and molecular studies have confirmed that *Pythium irregulare* sensu lato shows high levels of morphological and genetic diversity and is part of a species complex. An international collection of 120 isolates from greenhouses of Long Island - New York collected from diverse host were selected to investigate their phylogenetic relationship. Phylogenetic analyses were performed based on the characterization of the β -tubulin gene. Fragments of approximately 1200 bp of β -tubulin gene were amplified with the forward primer β tub_F1A and reverse primer β tub_R1A. The analysis under the maximum likelihood method included six sequences, four corresponding to *Pythium irregulare* species complex (*P. irregulare* sensu stricto, *P. cryptoirregulare*, *P. cylindrosporum*) and sequences of *Pythium spinosum* and *Pythium sylvaticum* as outgroups. The consensus phylogenetic tree obtained revealed the formation of three major groups with a moderate-high "bootstrap" support (p -value < 0.05). The results showed no clear separation between species within the *P. irregulare* complex, which is consistent with other preliminary studies. Discrimination among species of this complex is essential for the study of their epidemiology and management of diseases that cause.

Key words: *Pythium irregulare*, sensu lato, Phylogenetic, Maximum likelihood, Bootstrap.

INTRODUCCIÓN

Pythium es un género de oomicetos patógenos de plantas encontrados alrededor del mundo. Es un organismo único al ser capaz de penetrar las superficies de plantas hospederas, estableciendo rápidamente infecciones que pueden tener consecuencias severas para la producción agrícola. *Pythium irregulare* en invernaderos, viveros, campos agrícolas y bosques es conocido por causar la pudrición de semillas y de raíces de plantas, pudrición de frutos carnosos u otros órganos vegetales en contacto con el suelo y ahogamiento “damping-off” pre y post emergencia de plantas (Agrios, 2005).

La identificación de especies que pertenecen al género *Pythium* es difícil debido a similitudes y variaciones intraespecíficas en las características morfológicas que ocurren entre aislados individuales, por lo que, además de las características morfológicas, métodos moleculares son utilizados en estudios taxonómicos y han permitido incrementar la habilidad para identificar y caracterizar organismos que tienen pocos caracteres morfológicos variables (Garzón, Geiser, & Moorman, 2005).

Antes de la aplicación de la biología molecular moderna, la taxonomía de *Pythium* se basó principalmente en aspectos morfológicos y fisiológicos. Actualmente los análisis filogenéticos de secuencias en base a regiones o genes la han transformado y se han convertido en herramientas importantes pues no están sujetos a interacciones ambientales lo que los hace estables y reproducibles (Belbahri *et al.*, 2008).

El trabajo con cepas de *Pythium irregulare* sensu lato (s.l) colabora con una parte de una investigación llevada a cabo en la Universidad Estatal de Oklahoma (OSU) y cuyo objetivo es reconstruir la relación evolutiva de las especies pertenecientes al complejo *Pythium irregulare* sensu lato.

P. Garrido (comunicación personal, Mayo 6, 2013), responsable de la investigación, busca

reconstruir esta relación mediante un análisis multigénico. La contribución de este estudio es la caracterización del gen β -tubulina.

β -tubulina es un gen altamente conservado y común a todos los eucariotas usado para establecer comparaciones entre miembros de un mismo género, permitiendo la diferenciación de especies. Ha sido utilizado en la caracterización de patógenos y en la reconstrucción de relaciones filogenéticas (McCartney, Foster, Fraaije, & Ward, 2003).

La discriminación entre las especies de este complejo es fundamental para el estudio de su epidemiología y para el manejo de las enfermedades que causa.

Se propone en esta investigación que las cepas de *Pythium irregulare* sensu lato de Long Island, NY, son monofiléticas de acuerdo a las secuencias de β -tubulina.

METODOLOGÍA

Material de trabajo—Las 120 cepas de *Pythium irregulare* sensu lato utilizadas en este estudio fueron recolectadas de diferentes huéspedes y de diferentes invernaderos ubicados en Long Island, New York. Las cepas fueron previamente identificadas morfológicamente por los científicos del Centro de Horticultura de Long Island (New York), y fueron recibidas en OSU en forma de micelio liofilizado.

Amplificación de ADN y secuenciación—A partir de las cepas liofilizadas se procedió a la extracción de ADN con DNeasy Plant Mini kit de QIAGEN. Mediante espectrofotometría con el equipo NANODROP 1000 se determinó la concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas. Una porción del gen β -tubulina fue amplificado con el primer sentido β tub_F1A (GCCAAGTTCTGGGARGTSAT) y el primer antisentido β tub_R1A (CCTGGTACTGCTGGTAYTCMGA).

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de reacción de 25 μ L. (1.25 μ L de cada primer [5 ng/ μ L]; 2 μ L ADN [10 ng/ μ L]; 12.5 μ L de GoTaq® Green Master

Mix, 2X [Promega] y 8 μ L de agua estéril). Las amplificaciones fueron hechas con los siguientes parámetros: un ciclo a 95 °C por 2 min; 35 ciclos de 30 s del paso de denaturación a 94 °C, 30 s del paso de hibridación a 59 °C y 1 min del paso de extensión a 72 °C; seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Antes de purificar los productos de PCR para el paso de secuenciación, las amplificaciones fueron separadas en un gel de agarosa al 1% para evaluar la concentración y pureza de cada producto con el marcador de peso molecular de 100 pb (VWR cat. no. 95039-808).

Los productos de PCR se prepararon para la secuenciación con el sistema de purificación enzimática ExoSAP-IT PCR (Affymetrix), se incubó las muestras a 37 °C durante 15 min; seguido de un calentamiento a 80 °C durante 15 min. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su envío.

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el laboratorio central de análisis (Core Facility) de OSU en el equipo 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones con los primers usados para la amplificación.

Análisis de secuencias—Las secuencias de ADN obtenidas se limpiaron, alinearon y ensamblaron en el programa BioNumerics versión 7.01. Las secuencias sentido y antisentido se alinearon y se crearon secuencias consenso utilizando los parámetros de alineamiento por defecto. Las secuencias consenso se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos Blast Nucleotide del NCBI. Se utilizó el algoritmo Megablast para comparar las secuencias en estudio con otras secuencias con altos niveles de similitud. Se usó los parámetros por defecto y se incluyó el filtro para las regiones de baja complejidad para filtrar secuencias que no son informativas. Se evaluaron los parámetros de: identidad, cobertura de las

secuencias de interés, puntuación (Bit score) o puntuación de alineamiento (S) y el valor E o valor esperado.

Análisis filogenético—La relación filogenética de las muestras se determinó mediante el análisis de las secuencias obtenidas con los primers Btub_F1A y Btub_R1A. Además se incluyeron seis secuencias correspondientes a las diferentes especies del complejo *Pythium irregulare* (*P. irregulare* sensu stricto, *P. cryptoirregulare*, *P. cylindrosporum*) para el gen β -tubulina y las secuencias de las especies *Pythium spinosum* y *Pythium sylvaticum* como grupos externos o “outgroups” enlistadas en la TABLA I.

Tabla I. Lista de las especies de *Pythium* incluidas en el análisis filogenético

Muestra	Número de acceso GenBank (β -tubulina)	Referencia
<i>Pythium sylvaticum</i> ^a	GU071880.1	Spies <i>et al.</i> (2013)
<i>Pythium spinosum</i> ^a	GU071881.1	Spies <i>et al.</i> (2013)
<i>Pythium cylindrosporum</i>	GU071877.1	Spies <i>et al.</i> (2013)
<i>Pythium cryptoirregulare</i>	GU071888.1	Spies <i>et al.</i> (2013)
<i>Pythium irregulare</i>	AB512837.1	Senda & Kageyama (2009)
<i>Pythium irregulare</i>	AB512837.1	Senda & Kageyama (2009)

^a Especies usadas como “outgroups”.

El alineamiento múltiple se realizó con el software bioinformático MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 5.2 (Tamura *et al.*, 2013).

Se ingresaron en el programa un total de 123 secuencias de ADN, sin alinear y en formato FASTA. Se eligió Muscle como el algoritmo para la construcción del alineamiento. El alineamiento se hizo en base a codones por ser secuencias codificantes. Se hizo además un análisis de la composición nucleotídica de cada secuencia y de la frecuencia de pares de nucleótidos.

El árbol filogenético se construyó con el método estadístico de máxima verosimilitud

con el programa MEGA versión 5.01, modificando tres parámetros:

i) modelo/método: T92; ii) cambio entre sitios: sitios invariantes; iii) Gap/tratamiento de datos faltantes: delección parcial. La estimación de la fiabilidad del árbol construido se hizo mediante un análisis “bootstrap” con 1000 repeticiones con la opción incorporada en el programa MEGA, a partir de lo cual se elaboró un árbol consenso.

RESULTADOS

Amplificación y visualización del gen β _tubulina—Con el protocolo DNeasy Plant Mini kit de QIAGEN se extrajo el ADN genómico de las 120 cepas de *Pythium irregulare* s.l recibidas. El ADN de cada una de las muestras se cuantificó por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 1000, dando como resultado un rango de concentración de 3-800 μ L/ng y una relación de absorbancias promedio (260/280) de 1,8.

La reacción de PCR fue eficiente con la metodología que se empleó. Los primers β tub_F1A y β tub_R1A permitieron amplificar una parte del gen β _tubulina de las 120 muestras de ADN. Se observaron fragmentos de aproximadamente 1200 pb y con una concentración aproximada de 75 ng/ μ L en la mayoría de muestras analizadas aunque no en todas. En la figura 1 se muestra una fotografía con la amplificación de las bandas de 17 muestras de ADN.

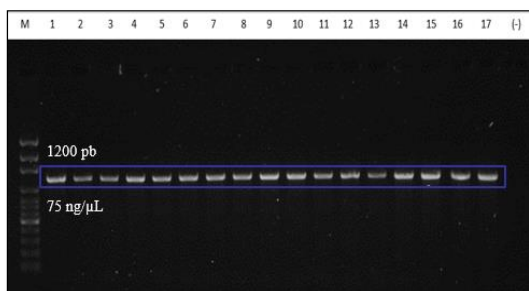


FIG. 1. Visualización del producto de PCR del gen β -tubulina amplificado de 17 muestras de ADN. (1:C145; 2:C147; 3:C149; 4:C152; 5:C153; 6: C156; 7: C158; 8:C160; 9:C161; 10:C162; 11:C164; 12:C165; 13:C167; 14:C169; 15:C171; 16:C178; 17:C179), en gel de agarosa al 1% p/v. M: Marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. (-): Control negativo de la reacción PCR. Las muestras se identifican por su código de estudio.

Los resultados de la secuenciación fueron remitidos en formato AB1 y FASTA.

Edición y registro de las secuencias obtenidas—Las secuencias y los cromatogramas enviados por el OSU Core Facility dio como resultado el alineamiento de las secuencias del primer sentido con las secuencias del primer antisentido de cada muestra. Se obtuvo un correcto alineamiento para 117 secuencias en estudio, con las que se crearon secuencias consenso en formato FASTA. Tres secuencias, del total de 120, generaron inconvenientes durante su edición y alineamiento. Las secuencias, según su código de estudio, correspondieron a las cepas C117, C135 y C256.

Análisis de similitud y homología de secuencias—La comparación de las secuencias editadas con las secuencias existentes en la base de datos del programa Blast permitió encontrar secuencias similares significativas para cada secuencia; además permitió una identificación a nivel de género y de especie de las mismas. De forma general, las secuencias asignadas por Blast más representativas a nivel de especie fueron: una cepa de *Pythium irregulare* (GenBank: AB512837) y otra cepa de *Pythium irregulare* (GenBank: AB512839).

El porcentaje de identidad tuvo un valor del 99% para todas las cepas, lo que permitió asegurar que el gen analizado pertenece taxonómicamente al género asignado *Pythium*. El porcentaje de cobertura de las secuencias analizadas dio en todos los casos un valor del 100 %, lo que indicó que las secuencias de consulta tenían una similitud de un 100 % con las secuencias de la base de datos y que el alineamiento de los nucleótidos (aproximadamente 1100) coincidió totalmente con los del género asignado. El puntaje de alineamiento fue diferente en todos los casos ya que este valor es dependiente de la longitud de las secuencias de interés La significancia del alineamiento se midió con el valor E que fue 0.0, lo que hizo válida la comparación estadísticamente.

Análisis estadístico de secuencias—La longitud de secuencias promedio fue de 1102 pb y hubo un mayor contenido de las bases Citocina (C) y Guanina (G), 29 % y 26.9 % respectivamente. Los dinucleótidos más significativos fueron TT, CC, GG, AA y los menos significantes fueron TA y AT.

Análisis filogenético

Alineamiento múltiple—El alineamiento múltiple con el algoritmo Muscle y el método estadístico de máxima verosimilitud dio como resultado una matriz de datos que comprendió 1475 caracteres de los cuales 365 eran conservados, 1090 eran caracteres variables y 1040 tenían parsimonia informativa.

Selección del modelo de sustitución— El modelo que mejor describió la sustitución de nucleótidos fue el de Tamura de tres parámetros (T92) con un ajuste por la presencia de sitios invariables (+I). La bondad de ajuste de cada modelo se midió por el criterio de información Bayesiano (BIC) y el criterio de información de Akaike corregido (Tamura *et al.*, 2013). El análisis involucró 123 secuencias nucleotídicas en donde todas las posiciones con menos del 95% de cobertura fueron eliminadas. Hubo un total de 901 posiciones en el conjunto de datos finales.

Construcción y evaluación estadística del árbol filogenético—El árbol filogenético se construyó en base a las secuencias del gen β -tubulina, con el método estadístico de máxima verosimilitud, en base al modelo de Tamura de tres parámetros (T92) y asumiendo que una cierta fracción de los sitios eran evolutivamente invariables (4.5221% de los sitios)

El árbol consenso “bootstrap” inferido con 1000 repeticiones representa la historia evolutiva de los taxones analizados. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones se agruparon en el test bootstrap se muestran sobre las ramas (FIG.2). La

topología del árbol condensado obtenido en base al gen β -tubulina, indicó la formación de tres grupos principales (I, II y III). En el grupo I se incluyen 73 taxones, algunos de ellos agrupados con un buen soporte y separados por pequeñas ramas internas, además sobresalen ramas que fueron condensadas resultando en politomías. En el grupo II se incluyen 45 taxones, en este grupo sobresalen también ramas condensadas que resultaron en politomías. El grupo III incluye tres taxones agrupados y con un buen soporte (FIG.2). El enraizamiento del árbol se consiguió incluyendo como grupos externos a secuencias de *Pythium spinosum* (GU071881.1) y *Pythium sylvaticum* (GU071880.1). Las relaciones de los tres grupos recibieron un soporte bootstrap moderado-alto (63-100%) en el análisis de máxima verosimilitud.

Se pudo observar además que de las cuatro secuencias referencia usadas de *Pythium* para el gen β -tubulina, tres de ellas: *Pythium irregulare* (AB512837.1), *Pythium irregulare* (AB512839.1) y *Pythium cylindrosporium* (GU071877.1) se agruparon en el grupo II y la secuencia de *Pythium cryptoirregulare* (GU071888.1) se agrupó en el grupo I.

El árbol consenso que se obtuvo provee información para pensar que las cepas de *Pythium irregulare* s.l tienen un ancestro en común, a pesar de no mostrar un porcentaje de ocurrencia mayor al 50% en todas sus ramas. El enraizamiento permitió observar que las cepas de *Pythium irregulare* s.l de Long Island.-New York son monofiléticas en base a las secuencias del gen β -tubulina.

DISCUSIÓN

Los estudios que investigan la asociación de las especies de *Pythium* con cultivos de plantas utilizan métodos basados en cultivos para su aislamiento y características morfológicas para identificar aislados a nivel de especie.

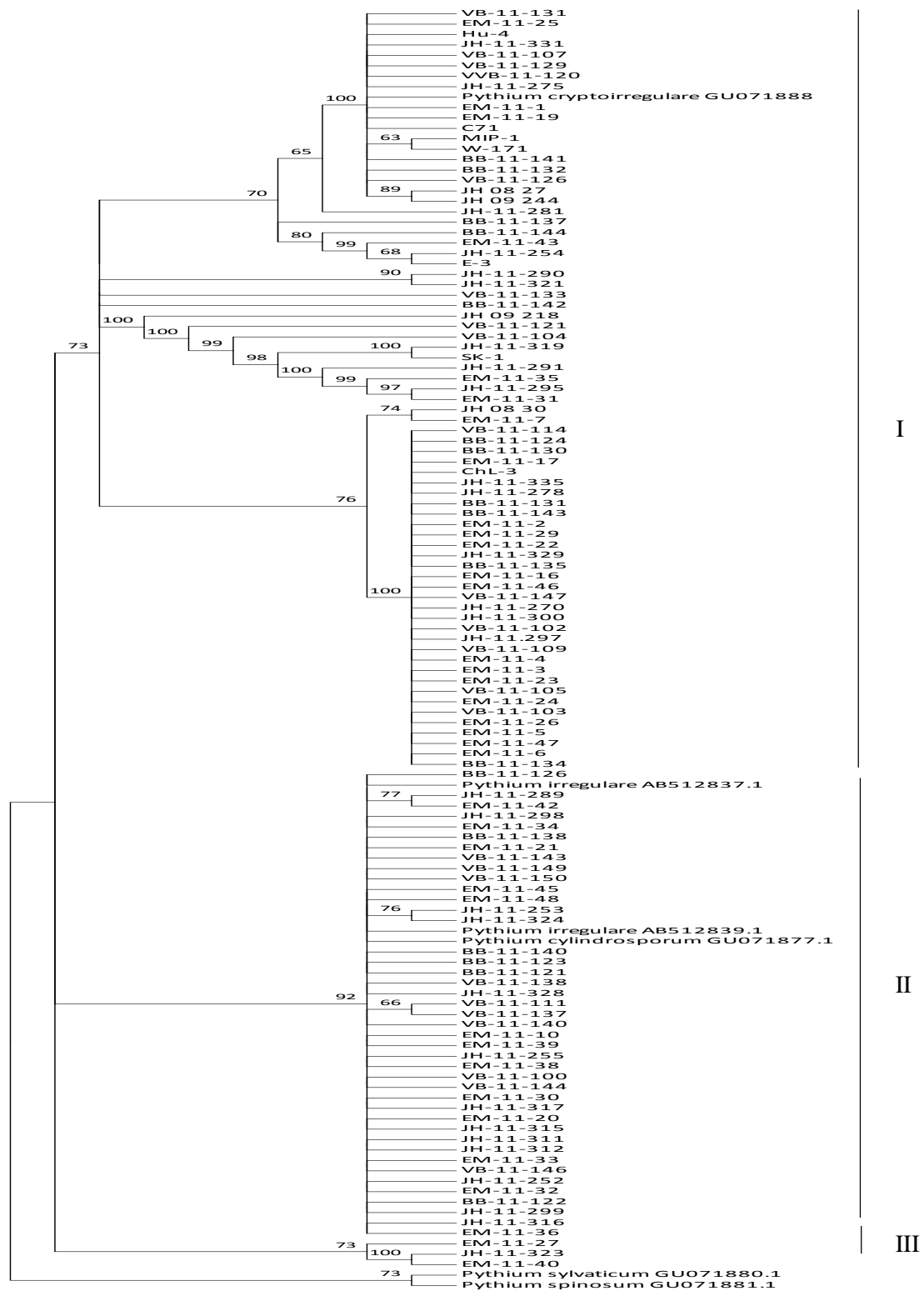


FIG. 2. Árbol consenso en base a secuencias del gen β -tubulina utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura de tres parámetros (T92+I). El árbol fue enraizado con *Pythium spinosum* y *Pythium sylvaticum* como grupos externos. Los números en las ramas representan los valores “bootstrap” calculados a partir de 1000 replicaciones (Sólo los valores superiores al 50% se muestran). Los taxones están identificados por su código de estudio.

La taxonomía de *Pythium* se ha basado principalmente en características morfológicas, algunas de las cuales son altamente variables o están ausentes en muchas especies. La variación no ha permitido llegar a un consenso para establecer las características morfológicas más importantes para la identificación de las especies (Long *et al.*, 2013; Senda, Kageyama, Suga & Lévesque, 2009).

El aislamiento de ADN es un primer paso para el estudio de secuencias de ADN. La utilización de protocolos de extracción de ADN rápidos y simples que sean capaces de obtener una alta cantidad y calidad de ADN es esencial para estudios filogenéticos de patógenos de plantas. Kits comerciales se utilizan ampliamente, en estudios por ser rápidos y permitir obtener ADN de calidad adecuada sin embargo, suelen ser caros, requieren la ejecución de muchos pasos en un corto tiempo y regularmente se obtienen bajas concentraciones de ADN (Zelaya-Molina, Ortega, & Dorrance, 2010).

En la investigación con el protocolo del kit DNeasy Plant Mini de QIAGEN se obtuvieron concentraciones de ADN en rangos desde 3 a 800 ng/uL, y una calidad promedio de ADN evaluada con la relación A260/A280 de 1.8. Generalmente un ensayo de tipo PCR con ADN de oomicetos requiere una concentración mínima de ADN de 10 ng/uL (Surzycki, 2000). En la mayoría de muestras se logró extraer la concentración adecuada excepto por unas cuantas con una concentración inferior que, a pesar de eso, amplificaron con la PCR. En el caso de la calidad del ADN el valor obtenido de la relación A260/A280 indicó que el ADN tenía una calidad aceptable para la PCR (Glasel, 1995; Maniatis, Fritsch, & Sambrook, 1982).

El objetivo del estudio fue utilizar el gen β -tubulina como un loci informativo a nivel filogenético. B-tubulina es un gen que no contiene intrones, que es conservado en los eucariotas y que permite la identificación de especies en muchos grupos biológicos (Villa *et al.*, 2006; Blair *et al.*, 2008).

En el estudio se usó una porción del gen β -tubulina (1226 pb). Su amplificación se hizo con el par de primers Btub_F1A y Btub_R1A que fueron diseñados para amplificar secuencias parciales del gen β -tubulina en aislados de *Phytophthora*. Con los primers se logró amplificar la porción del gen β -tubulina en las 120 cepas de *Pythium irregulare* s.l., provenientes de invernaderos de Long Island New York y de distintos huéspedes, las cuales estuvieron en el rango de peso molecular esperado (1226 pb).

Se empleó la secuenciación del gen para caracterizar las cepas en estudio. Pese a sus ventajas, durante la secuenciación de ADN hay muchas variables que puede afectar la calidad de la información, por eso resulta importante evaluar la información generada mediante herramientas y software que ayuden a determinar errores que pudieron ocurrir durante el proceso (The Perkin-Elmer Corporation, 2008). En la investigación, las secuencias enviadas por OSU fueron analizadas evaluando sus cromatogramas, alineando la cadena sentido y antisentido y verificando la correcta asignación de bases entre ambas cadenas (sentido y antisentido) con el programa BioNumerics versión 7.01.

Ciento diecisiete de las 120 secuencias fueron editadas, alineadas y ensambladas. Tres de las secuencias presentaron problemas debido a la mala calidad de las mismas, lo que no permitió su alineamiento; además en los cromatogramas de cada una se observó principalmente problemas como ruido de fondo y secuencias superpuestas que pudieron aparecer por una baja concentración del ADN, por la presencia de cantidades importantes de contaminantes o por la presencia de primers de PCR de pasos anteriores que no se eliminaron en el paso de purificación (Soria, 2000).

Para las 117 secuencias se pudo generar secuencias consenso que representan a cada conjunto de secuencias o contig (Cañizares y Blanca, 2013). Las secuencias fueron sometidas a un análisis Blast con el fin de conocer el grado de similitud entre las

secuencias en estudio y las secuencias registradas en la base de datos Blast. El valor de porcentaje de cobertura de las secuencias de interés fue de un 100 %, indicando así que las secuencias analizadas tenían una similitud de un 100 % con el mejor resultado devuelto por la base de datos y que el alineamiento de los nucleótidos coincidió totalmente con los del género y especie asignados. Por otro lado, el valor de porcentaje de identidad del 99% permitió asegurar que el gen analizado pertenece taxonómicamente al género *Pythium* (Hall, 2013) y que las secuencias problema son similares en un 99 % a secuencias de *Pythium irregulare* para el gen β -tubulina. El valor E tuvo un valor de 0.0, siendo el mejor valor posible, ya que cuanto más bajo sea el valor E, más significativa es la puntuación. Según el análisis Blast, las secuencias son homólogas en el sentido de que los emparejamientos resultantes tienen un alto nivel de significancia. La identificación de secuencias similares es importante pues la similitud es el principal predictor de homología y la homología es el principal predictor de función (Guttman *et al.*, 2014; Rahman, 2007).

El alineamiento múltiple con el algoritmo Muscle (comparación de secuencias múltiples por log-expectativa), tiene como paso fundamental la alineación de perfiles por parejas que después se utilizan para una alineación progresiva, refinamiento y la construcción de un árbol guía (Edgar, 2004), evidenció diferencias entre las secuencias de cada cepa. Solo cierto número de posiciones alinearon y conservaron bases entre todas las secuencias de las cepas en estudio.

El proceso de encontrar un árbol filogenético utilizando máxima verosimilitud implica la búsqueda de una topología y de las longitudes de las ramas de un árbol que den la mayor probabilidad de observar las secuencias de ADN en nuestros datos (Cho, 2012). En los últimos años, se ha dado un creciente interés en producir árboles filogenéticos precisos utilizando este enfoque estadístico, principalmente por su versatilidad y por su

aplicación en una gran cantidad de situaciones (Keane, Naughton, Travers, McInerney, & McCormack, 2005).

El árbol que dio la mayor probabilidad tuvo un valor de log likelihood superior de -11917.62. El valor log likelihood representa la función de probabilidad o verosimilitud. El modelo de sustitución y evolución que resultó ajustarse de mejor manera a los datos fue el de Tamura de tres parámetros (T92). La elección del modelo indica que hay fuertes eventos de transición-transversión y sesgos en el contenido de G+C (Mina y Romero-Campero, 2012).

El árbol filogenético obtenido fue de tipo cladograma, un diagrama de ramificación donde las ramas tienen la misma longitud y en donde se muestra un ancestro en común, pero no se indica el tiempo evolutivo que separa a cada taxón (Duduk, 2009). Un primer árbol construido mostraba que no todas las ramas eran significativas, por lo que fue necesario construir un árbol condensado para dar más significancia a las ramas.

El árbol consenso que se obtuvo provee información para pensar que las cepas de *Pythium irregulare* s.l tienen un ancestro en común, a pesar de lo cual, el árbol no muestra un porcentaje de ocurrencia mayor al 50% en todas sus ramas. A cada rama se le asigna un porcentaje de ocurrencia y, de esta manera, se asume que una rama es significativa si aparece más del 50% o 70% de las veces, las ramas restantes pueden ser condensadas resultando en politomías (Mina y Romero-Campero, 2012).

La topología del árbol consenso indicó la formación de tres grupos principales (I, II y III) con un soporte bootstrap moderado-alto (63-100%). En los grupos I y II sobresalieron ramas que fueron condensadas resultando en politomías. También se observó que las secuencias referencias *Pythium irregulare* (AB512837.1), *Pythium irregulare* (AB512839.1) y *Pythium cylindrosporium* (GU071877.1) se agruparon en el grupo II y la secuencia de *Pythium cryptoirregulare*

(GU071888.1) se agrupó en el grupo I.

La condensación de las ramas que resultaron en politomías, nodos con más de dos linajes descendientes, puede ser indicio de dos cosas: falta de conocimiento o eventos de especiación rápida. Las politomías pueden resolverse cuando se reúnen más datos (Blanca & Cañizares, 2010).

La definición de la posición del ancestro hipotético en el árbol, conocido como enraizamiento de un árbol, es una de las cosas que causa confusión en filogenética. Una de las estrategias para el enraizamiento de un árbol filogenético es utilizar grupos externos (outgroups). Un outgroup es una o más especies que se saben están alejadas de todos los demás taxones en el árbol (Edwards, 2012), pero están emparentadas a ellos, y su inclusión facilita el determinar si un grupo, en este caso las cepas en estudio, forman grupos monofiléticos. En el estudio el enraizamiento se consiguió incluyendo como outgroups a *Pythium spinosum* y *Pythium sylvaticum*, dos especies alejadas de *Pythium irregulare*. El enraizamiento permitió observar que las cepas de *Pythium irregulare* s.l. estudiadas son monofiléticas en base a las secuencias del gen β -tubulina.

La investigación permitió establecer la relación filogenética de cepas de *Pythium irregulare* s.l., un oomicete y agente causal de algunas de las enfermedades más serias en plantas, mediante la caracterización del gen β -tubulina, con el propósito de diferenciar y estimar su relación filogenética.

Se determinó que las cepas al compartir un ancestro en común, se agrupan cercanamente entre sí. La investigación también proporcionó información para la identificación de *Pythium irregulare* s.l. como patógeno utilizando métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.

Estudios de este tipo permiten determinar la relación jerárquica entre especies en función de su relación evolutiva y contribuyen con información útil para la implementación de estrategias en el control y gestión de

enfermedades causadas por patógenos de plantas (Garzón *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

El protocolo del kit QIAGEN para la obtención de ADN a partir de micelio liofilizado permitió la obtención de ADN de alta calidad y concentración, facilitando la amplificación del gen β -tubulina en todas las cepas de estudio.

La amplificación y secuenciación el gen β -tubulina de las cepas de *Pythium irregulare* sensu lato permitió observar fragmentos de aproximadamente 1200 pb que están en el rango de peso molecular esperado (1226 pb).

Ciento diecisiete secuencias consenso se registraron en archivos formato FASTA a partir del análisis, edición y ensamblaje de los datos generados después de la secuenciación, con el programa BioNumerics.

El alineamiento múltiple de las secuencias con el algoritmo Muscle y bajo el método estadístico de máxima verosimilitud, evidenció diferencias entre las secuencias de cada cepa. Solo cierto número de posiciones alinearon y conservaron bases entre todas las secuencias de las cepas en estudio.

El modelo de sustitución y evolución que mejor se ajustó a los datos fue el de Tamura de tres parámetros (T92). Con el modelo se construyó un árbol filogenético en el cual destacan los eventos fuertes de transición-transversión y el sesgo en el contenido de G +C.

El árbol filogenético basado en el modelo de Tamura de tres parámetros (T92) y evaluado estadísticamente mediante una prueba "bootstrap" con 1000 repeticiones, reveló la presencia de tres grupos principales (I, II y III) y de ramas restantes condensadas que resultaron en politomías.

Las relaciones de los tres grupos principales formados en el árbol filogenético recibieron un soporte "bootstrap" moderado-alto (63-100%) en el análisis de máxima verosimilitud. No hubo una clara separación entre las especies dentro del complejo

Pythium irregulare, lo cual es consistente con otros estudios preliminares.

El árbol consenso obtenido para las cepas de *Pythium irregulare* s.l. de Long Island New York, proporcionó información para asegurar que comparten un ancestro en común ya que se agrupan cercanamente entre sí. Las cepas de *Pythium irregulare* s.l. son monofiléticas en base al análisis de secuencias del gen β -tubulina.

El análisis del gen β -tubulina como loci individual es útil para resolver relaciones entre especies pero no garantiza una filogenia de especies completamente segura, particularmente si las especies son muy cercanas. El análisis filogenético de genes individuales solo provee una estimación de las relaciones evolutivas entre las secuencias de ese gen obtenidas de un grupo de muestras.

La investigación proporcionó información para la identificación de *Pythium irregulare* como patógeno utilizando métodos moleculares basados en PCR y la secuenciación del gen de β tubulina.

RECOMENDACIONES

Obtener el resultado del alineamiento múltiple de secuencias de varias fuentes y compararlas cuidadosamente para identificar el mejor.

Construir alineamientos y otros árboles filogenéticos con diferentes métodos estadísticos como máxima parsimonia (MP) y análisis bayesianos (BA), con el fin de comparar si todos los árboles producen una misma topología.

Construir árboles multilocus para obtener mayor evidencia estadística que muestren un porcentaje de ocurrencia mayor al 70% en todas sus ramas para asegurar que los organismos comparten un mismo ancestro en común.

Realizar un análisis concatenado de genes para la reconstrucción filogenética de las cepas de *Pythium irregulare* s.l. de Long Island New York, porque se evidenció que con el análisis de un solo gen, β -tubulina, se

obtienen árboles con baja resolución entre especies muy cercanas.

Validar los métodos empleados en este estudio usando muestras del Ecuador a partir del aislamiento de cepas de *Pythium* spp. en medios selectivos, identificación en base a morfología e identificación molecular con la técnica PCR y con secuenciación, con el fin de identificar las especies de *Pythium* encontradas en campos del país.

AGRADECIMIENTOS

A M.S. Margery Daughtrey, del Centro de Horticultura de Long Island, Departamento de Fitopatología y Biología de Plantas y Microbios, Universidad de Cornell, por proveer las muestras analizadas en este estudio. Al laboratorio central de análisis (Core Facility) de la Universidad Estatal de Oklahoma por secuenciar las cepas en estudio. A la Ph.D. Carla Garzón y la Ing. Patricia Garrido por su asesoramiento y guía durante la investigación y a la MC. Alma Koch y el Ing. Mat. Pedro Romero por su dirección y apoyo.

Esta investigación es parte del convenio entre el laboratorio de Microbiología, perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y el Departamento de Entomología y Patología de Plantas de la Universidad Estatal de Oklahoma (OSU), USA.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. USA: Elsevier.
- Belbahri, L., McLeod, A., Paul, B., Calmin, G., Moralejo, E., Spies, C., . . . Lefort, F. (2008). Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rDNA region of *Pythium mercuriale* sp. nov., FEMS. *Microbiology Letters*, 284(1), 17-27.
- Blair, J., Coffey, M., Park, S.-Y., Geiser, D., & Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for

- Phytophthora utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 266–277. doi:10.1016/j.fgb.2007.10.010
- Blanca, J., & Cañizares, J. (2010). *Bioinformatics at COMAV*. Recuperado el 7 de Noviembre de 2013, de http://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/filogenias.html
- Cañizares, J., & Blanca, J. (2013). *Ensamblaje y mapeo de secuencias tipo Sanger*. Recuperado el 17 de Octubre de 2013, de <http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/ensamblaje.html>
- Cho, A. (2012). Constructing Phylogenetic Trees Using Maximum Likelihood. *Scripps Senior Theses*(46). Recuperado el 8 de Enero de 2014
- Duduk, B. (2009). Phylogenetic tree construction. *Institute for Pesticides and Environmental Protection*.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Edwards, R. (7 de Junio de 2012). *How to root a phylogenetic tree*. Recuperado el 21 de Octubre de 2013, de The cabbages of doom: <http://cabbagesofdoom.blogspot.com/2012/06/how-to-root-phylogenetic-tree.html>
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125(1), 1-15.
- Garzón, C. D., Geiser, D. M., & Moorman, G. W. (2005). Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Internal Transcribed Spacer and coxII Sequences Reveal a Species Boundary Within *Pythium irregulare*. *The American Phytopathological Society*, 95(12), 1489-1498. doi:10.1094/PHTO-95-1489
- Garzón, C. D., Geiser, D. M., & Moorman, G. W. (2005). Diagnosis and Population Analysis of *Pythium* Species Using AFLP Fingerprinting. *The American Phytopathological Society*, 89, 81-89. doi:10.1094/PD-89-0081
- Garzón, C. D., Yáñez, J. M., & Moorman, G. W. (2007). *Pythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. *Mycologia*, 99(2), 291–301.
- Glasel, J. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by A260/A280 absorbance ratios. *Biotechniques*.
- Guttman, D., Provart, N., Austin, R., Hug, L., & Price, M. (2014). *Bioinformatic Methods I. LAB 1a — EXPLORING NCBI*. 1-22.
- Keane, T., Naughton, T., Travers, S., McInerney, J., & McCormack, G. (2005). DPRml: distributed phylogeny reconstruction by maximum likelihood. *Phylogenetics*, 21(7), 969–974. doi:10.1093/bioinformatics/bti100
- Long, Y.-Y., Wei, J.-G., Sun, X., He, Y.-Q., Luo, J.-T., & Guo, L.-D. (2011). Two new *Pythium* species from China based on the morphology and DNA sequence data. *Mycol Progress*. doi:10.1007/s11557-011-0778-6
- Maniatis, T., Fritsch, R., & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Meng, S., Torto Alalibo, T., Chibucos, M. C., Tyler, B. M., & Dean, R. A. (2009). Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. *BMC Microbiology*, 9. doi:10.1186/1471-2180-9-S1-S7
- Rahman, N. N. (2007). *Bioinformatics: Analyzing DNA Sequence using BLAST*. DHAKA: BRAC University.
- Senda, M., Kageyama, K., Suga, H., & Lévesque, A. (2009). Two new species of *Pythium*, *P. senticosum* and *P. takayamanum*, isolated from cool-temperate forest soil in Japan. *Mycologia*, 101(4), 439-448. doi:10.3852/08-104.
- Soria, M. (2000). *Curso Introducción a la Bioinformática. Aplicaciones en Agricultura. Clase 6. Análisis de secuencias de ADN. Programas para diseño de primers para PCR*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2013, de <https://sites.google.com/a/agro.uba.ar/bioinformatica/Home/clase-6-primers-para-pcr>

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2013). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10), 2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121

The Perkin-Elmer Corporation. (2008). *Automated DNA sequencing. Chemistry guide. PE Applied Bio systems*. Recuperado el 2013

TheVilla, N. O., Kageyama, K., Asano, T., & Sura, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *The Mycological Society of America*, 410–422.

Zelaya-Molina, L., Ortega, M., & Dorrance, A. (2010). Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnol Lett*, 33, 715-720. doi:10.1007/s10529-010-0478-3